

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 922**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/24 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2012 E 12754797 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2683831**

54 Título: **Sistemas rápidos de purificación celular**

30 Prioridad:

07.03.2011 US 201161449824 P

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

24.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**METZGER, STEVEN W. y
HANCE, KENNETH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 922 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

Sistemas rápidos de purificación celular

Campo

5 Esta descripción se refiere a métodos y sistemas para purificar células y/o virus, en particular microorganismos en una muestra, en particular en preparación para sistemas diagnósticos.

Antecedentes

10 Los sistemas diagnósticos que detectan células y/o virus presentan interés clínico y diagnóstico. A menudo, la detección de células y/o virus se ve impedida o complicada por la presencia de contaminantes que interfieren con la captación o detección de células y/o virus. Esto puede ser así, en particular, para células o virus que se adhieren o se fijan a una superficie sólida antes de la detección.

15 Además, la variabilidad debida al operario puede afectar negativamente a la calidad del espécimen. La calidad del espécimen depende de factores del paciente, entre ellos, pero sin limitación, diferencias entre pacientes, y de la presencia o ausencia de diversas sustancias interferentes. En muchos casos, se divide el espécimen y se analiza utilizando diversos ensayos diagnósticos. Por tanto, la purificación de muestras de forma fiable y rentable para eliminar faltas de homogeneidad ayuda a mejorar la probabilidad de un muestreo estadístico significativo de las células y/o los virus de las mismas.

Compendio

20 Se proporcionan métodos y sistemas para purificar un microorganismo. Se añade la muestra a un pocillo dispuesto en un medio. Se aplica un potencial a través del medio para hacer que los contaminantes penetren en una o más paredes del pocillo, mientras que las células y/o los virus quedan retenidos en el pocillo. Se pueden extraer del pocillo las células y/o los virus y, opcionalmente, adherirse o fijarse a una superficie, o detectarse. En una realización, las células y/o los virus pueden quedar retenidos en el pocillo por incrustación en el medio. Se puede cortar o retirar de otra forma el medio que incluye las células y/o los virus incrustados, y transferirlo a un portaobjetos de vidrio u otra superficie sólida. Después se puede trocear o dividir el medio para que corresponda a los pocillos respectivos. Luego se seca el medio, se tiñe según Gram y se detectan las células y/o los virus.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva de una realización de un sistema utilizado para purificar un microorganismo.

La Figura 2A es una vista en perspectiva de una realización de un medio en un casete, que se puede utilizar con el sistema de la Figura 1.

30 La Figura 2B es una vista parcial en perspectiva de otra realización de un medio en un casete, que se puede utilizar con el sistema de la Figura 1.

La Figura 2C representa una vista lateral del medio y sistema de la Figura 2B.

Las Figuras 2D y 2E ilustran el corte de una parte del medio de la Figura 2B.

Las Figuras 2F, 2G y 2H representan la parte cortada del medio de las Figuras 2D y 2E, sobre una superficie sólida.

35 La Figura 2I representa microorganismos teñidos según Gram que pueden detectarse conforme a los sistemas y métodos descritos en la presente memoria.

La Figura 2J es una vista superior de un medio en un casete que se puede utilizar con el sistema de la Figura 1, en donde se utiliza un dispositivo localizador para localizar las células y/o los virus.

40 La Figura 2K representa microorganismos teñidos según Gram que pueden detectarse conforme a los sistemas y métodos descritos en la presente memoria.

La Figura 3 es una vista lateral de una realización de un peine formador de pocillos utilizado para formar pocillos en un medio.

45 Las Figuras 4A y 4B son una vista en perspectiva de un conjunto estratificado de celdas de flujo múltiples y una vista interior de una celda de flujo individual con correspondientes detalles de electrodos y circuito utilizados para crear un potencial a través de un medio.

La Figura 5 es un gráfico que presenta resultados de objetos acumulados (materiales sólidos inmovilizados sobre una superficie) en el transcurso del tiempo para muestras tratadas, en comparación con muestras no tratadas.

Las Figuras 6A, 6B y 6C representan imágenes microscópicas en el transcurso del tiempo de muestras no tratadas.

Las Figuras 7A, 7B y 7C representan imágenes microscópicas en el transcurso del tiempo de muestras tratadas.

La Figura 8 es una vista lateral de una realización de un pocillo circular formado en un medio, con electrodos correspondientes.

5 La Figura 9 es una vista lateral de una realización de una cámara formada en el medio, con orificio de entrada y de salida que permiten hacer circular la muestra.

Descripción detallada

10 Se describen en la presente memoria diversas realizaciones de sistemas y métodos para purificar células y/o virus de una muestra. Se añade una muestra que contiene células y/o virus a un pocillo dispuesto en un medio. Se aplica un potencial a través del medio para provocar que penetren contaminantes en el medio a través de una o más paredes de dicho pocillo, que retiene las células y/o los virus en el pocillo. Después se extraen del pocillo las células y/o los virus. También pueden permanecer las células y/o los virus en o sobre la pared del pocillo, y/o se puede cortar la pared y/o el pocillo para ulterior análisis.

15 Los sistemas y métodos descritos en la presente memoria pueden concentrar en los pocillos células y/o virus de un espécimen o muestra con bajo contenido, eliminando o reduciendo así restos potencialmente interferentes y dando como resultado especímenes más legibles. Por ejemplo, los métodos y sistemas descritos se pueden utilizar en el análisis de especímenes de LCR (líquido cefalorraquídeo) u otros especímenes hipocelulares. En tales muestras, se pueden localizar organismos bacterianos en zonas de captura de campo de visión 5x5 (aumento de objetivo 100x) con el fin de acortar la lenta búsqueda durante el examen microscópico. También se puede utilizar un sistema con múltiples pocillos, para facilitar el tratamiento en paralelo de alícuotas de muestra en el caso de análisis simultáneos
20 mediante métodos descendentes múltiples.

En la Figura 1 se representa una realización ilustrativa del sistema. La Figura 1 representa un sistema 100 utilizado para purificar células y/o virus con un casete 106 configurado para recibir un medio (no mostrado). El casete 106 incluye una placa de fondo 108 y lados 110. El electrodo negativo 102 y el electrodo positivo 104 están conectados de manera operativa al medio a través de un tampón (no mostrado) situado en un depósito 112.

25 La muestra se añade a un pocillo dispuesto en un medio, preferiblemente formado en el medio. En algunas realizaciones, también puede estar dispuesto en el medio un pocillo de plástico, además del o de los pocillos formados en el medio. Se aplica un potencial eléctrico al pocillo, haciendo que penetre material contaminante en el medio mientras que las células y/o los virus se acumulan en la pared del pocillo. En algunas realizaciones, se pueden localizar las células y/o los virus en la pared del pocillo. Las células y/o los virus quedan en el pocillo, purificando así la muestra. Se puede mezclar la muestra durante la aplicación de campo eléctrico o después de un período de tiempo. En algunas realizaciones, se puede repetir el proceso hasta que se haya logrado la separación de contaminantes que interfieren con la adhesión a una superficie de detección. Después se puede enjuagar el pocillo, y recuperar las células y/o los virus. En algunas realizaciones, se puede cortar la pared del pocillo donde se han acumulado las células y/o los virus o separarla de otro modo del resto del medio de gel. Como alternativa, se
30 puede invertir brevemente la polaridad del potencial eléctrico a fin de desplazar las células y/o los virus de la pared antes del enjuague y recuperación. La mezcladura, aplicación de potencial y/o inversión de la polaridad del campo aplicado se pueden realizar de forma iterativa para purificar aún más la muestra.

35 En algunas realizaciones, el volumen de muestra recuperada es menor que el volumen inicial de muestra en los pocillos, y a veces sustancialmente menor que este. En una realización, se inserta en los pocillos una barrera, como una lámina de plástico impermeable, y se utiliza para reducir el volumen de los pocillos, concentrando así aún más las células y/o los virus en el pocillo y procurando un volumen de muestra reducido para la recuperación.

Se pueden conseguir sistemas, incluidos cubetas de electroforesis y electrodos, de Thermo Fisher (Waltham, MA) bajo el nombre de marca EC-Apparatus (por ejemplo, el número de producto EC 250-90).

45 La Figura 2A representa una realización de un medio en un casete 106 que comprende una placa de fondo 108 y lados 110, que se puede utilizar con el sistema 100. En el casete 106 está dispuesto un medio 220 con una pluralidad de pocillos 222 en el medio 220. Se añade a algunos pocillos 222 una muestra 224 mediante una pipeta 226 que comprende una punta 228 de pipeta. Aunque se muestra el medio como una plancha de gel para cargar por arriba, se pueden utilizar medios con otras formas, entre ellas, pero sin limitación, planchas de gel verticales.

50 La Figura 2B ilustra una realización en la que está dispuesto en el casete 106 un medio 220 que presenta una pluralidad de pocillos 222 en el medio 220. Se añade una muestra y se aplica un potencial entre electrodo negativo 102 y electrodo positivo 104 como se describe en otra parte de la presente memoria, para hacer que penetre material contaminante en el medio mientras que las células y/o los virus 201 se acumulan o quedan incrustados en la pared 223 del pocillo 222, lo que se representa en la Figura 2C como células concentradas 202. Como se expone en las Figuras 2D-2E, se corta una parte 230 del medio, que incluye al menos una parte de los pocillos 222, por ejemplo troceando el medio a lo largo de planos de corte definidos por las líneas A-A' y B-B', o se retira de otra manera del medio. En algunas realizaciones, el corte se puede automatizar robóticamente.

Tras el corte, se puede fijar la parte recortada del medio, por ejemplo, para teñirla o extraer muestras moleculares para análisis. En algunas realizaciones, como se expone en las Figuras 2F y 2G, se puede colocar la parte cortada 230 sobre una superficie sólida 232, tal como un portaobjetos de vidrio, y se puede seccionar en cada pocillo 222 la parte cortada 230, proporcionando secciones 231. Se pueden secar las secciones 231 de la parte cortada 230, teñirlas según Gram y someterlas a detección como se indica en las Figuras 2H-2I. En algunas realizaciones, se puede introducir en un equipo de tinción según Gram automatizado un portaobjetos preparado (por ejemplo, en donde se ha secado la parte cortada y seccionada).

En algunas realizaciones, se pueden localizar las células y/o los virus en la pared del pocillo mediante, o con la ayuda de, un dispositivo localizador 240. Las Figuras 2J y 2K representan una realización que ilustra un dispositivo localizador 240 y células localizadas 241. La Figura 2J es una vista superior de un medio de gel que utiliza materiales no conductores como dispositivo localizador con el fin de distorsionar el campo eléctrico, dando lugar a la concentración localizada de células y/o virus, por ejemplo microorganismos. La Figura 2J ilustra una realización en la que en el casete 106 está dispuesto el medio 220 que presenta una pluralidad de pocillos 222, incluido un pocillo de plástico 224, en el medio 220. El medio 220 incluye un extremo proximal 220A y un extremo distal 220B. Dispuesto entre los pocillos 222 y el medio 220 se encuentra un dispositivo localizador 240 que comprende un material no conductor que incluye al menos un orificio o abertura 240A. Se añade una muestra y se aplica un potencial, como se describe en otra parte en la presente memoria, para hacer que penetre material contaminante en el medio mientras que las células y/o los virus se acumulan o quedan incrustados en la pared 223 del pocillo 222. En esta realización, la muestra fluye a través de la abertura 240A hacia el dispositivo localizador no conductor 240, localizando así las células y/o los virus que se acumulan o quedan incrustados en la pared 223 del pocillo 222 como se ha descrito con referencia a la Figura 2C. En esta realización, el dispositivo localizador no conductor 240 impide o inhibe que la muestra fluya a cualquier otro lugar que no sea a través de la o las aberturas 240A. En una realización, el material no conductor puede ser una película de plástico. Como se ha descrito más arriba con referencia a las Figuras 2D-2I, se corta o retira de otro modo una parte del medio 220, que incluye al menos una parte de los pocillos 222. Se puede colocar la parte cortada 230 sobre una superficie sólida 232, como un portaobjetos de vidrio, y se puede secar, teñir según Gram y someter a detección. La Figura 2K representa microorganismos localizados 241, teñidos según Gram, que han sido localizados conforme a los métodos y sistemas descritos en la presente memoria.

Aunque las Figuras 2J y 2K representan una realización de un sistema y método para localización mediante un dispositivo localizador 240 que comprende materiales no conductores, también se pueden utilizar para la localización otros métodos y dispositivos. En una realización, el dispositivo localizador es un material conductor, como un alambre de metal o aleación metálica, que está incrustado en un extremo distal 220B del medio 220 o colocado cerca del mismo (por ejemplo, corriente abajo con respecto a la dirección de migración). Cuando se aplica un potencial, las células y/o los virus se localizan en la pared del pocillo en una ubicación correspondiente a la posición del material conductor. Es decir, cuando el material conductor es un hilo metálico recto, las células y/o los virus se localizan en la pared del pocillo en una línea recta correspondiente a la línea del alambre metálico. En otra realización, se utilizan dispositivos localizadores que incluyen electrodos grandes y pequeños (o discretos). Por ejemplo, se puede colocar un electrodo grande, como un electrodo de lámina, en una ubicación proximal con respecto al extremo proximal 220A del medio 220. Se puede colocar un electrodo pequeño en una ubicación distal con respecto al extremo distal 220B del medio 220. Cuando se aplica un potencial, las células y/o los virus se localizan en la pared del pocillo en una ubicación correspondiente a la ubicación del electrodo pequeño. En otras realizaciones más, el dispositivo localizador es un sistema de tampón discontinuo. En un sistema de este tipo, la conductividad dentro del pocillo es diferente de la conductividad fuera del pocillo. Por ejemplo, cuando un pocillo está constituido por medio, la conductividad de la muestra y la conductividad del pocillo son diferentes. Cuando se aplica un potencial, las células y/o los virus se localizan en la pared del pocillo debido, al menos en parte, a esta diferencia de conductividad.

Se pueden utilizar tintes en las muestras para marcarlas de antemano, o bien se pueden añadir para proporcionar un tinte trazador para conseguir una referencia cuantitativa o bien un indicador de control de la calidad de la transferencia de la muestra. Los ejemplos de tintes incluyen colorantes, adyuvantes bioactivos tales como anticuerpos marcados, tinciones vitales, tinciones mortales (tales como yoduro de propidio y similares). Para observar el flujo electroosmótico se pueden utilizar moléculas de tinte de ion híbrido (zwitteriónicas) o con carga neutra.

El potencial aplicado a través del medio eficaz para la eliminación de contaminantes se puede aplicar durante un tiempo variable, y depende de la conductividad de la muestra. Por ejemplo, para muestras recuperadas utilizando solución salina normal y que tengan una conductividad próxima a la de solución salina normal, por ejemplo, se puede aplicar el potencial durante 1 a 60 minutos.

En algunas realizaciones, el método incluye un potencial alternante asimétrico. En otras formas de realización, el potencial es un potencial constante. En diversas realizaciones, el potencial aplicado induce flujo electroosmótico que se utiliza para eliminar contaminantes que tengan una carga neutra. Se puede invertir la polaridad del potencial con el fin de desplazar células y/o virus de la superficie del medio. En algunas realizaciones, el método incluye aplicar un flujo tangencial a través del medio con el fin de eliminar de la superficie del medio contaminantes no permeables. El flujo tangencial se puede aplicar derramando la muestra sobre el medio. Se puede generar el flujo tangencial mediante el uso de tampón adicional que no sea la muestra. Se puede hacer circular continuamente el flujo sobre el

medio.

Cuando se toma una muestra de un paciente, en la muestra se presentan diversos componentes. Por ejemplo, en un paciente que padece neumonía, una muestra puede incluir solución salina, especies aniónicas y catiónicas, tensioactivos pulmonares, bacterias, moco, sangre, células hospedadoras tales como leucocitos y/o células de tejido pulmonar. Los componentes del moco incluyen, pero sin limitación, glicoproteínas mucosales, proteínas, ácidos nucleicos extracelulares, F-actina, fragmentos de leucocitos lisados. Los componentes sanguíneos pueden incluir, pero sin limitación, eritrocitos, leucocitos, plaquetas y plasma. Los componentes del plasma pueden incluir, pero sin limitación, azúcar, grasa, proteína y solución salina, plaquetas, factores de coagulación sanguínea, azúcares, lípidos, vitaminas, minerales, hormonas, enzimas, anticuerpos y otras proteínas, entre ellas heme, albúminas, inmunoglobulinas, fibrinógenos, proteínas reguladoras, lipoproteínas (quilomicrones, VLDL, LDL, HDL), transferrina, protrombina, enzimas, proenzimas, antibióticos residuales utilizados para tratar al paciente y hormonas. Los componentes de tejido pulmonar incluyen células hospedadoras epiteliales (intactas o lisadas). Las células de las paredes alveolares del pulmón producen y secretan tensioactivo pulmonar. El tensioactivo pulmonar es una mezcla de fosfolípidos y proteínas. En muestras pulmonares también pueden estar presentes leucocitos. Todos los componentes anteriores pueden estar solubilizados.

En algunas realizaciones, las células incluyen células sanguíneas, células fúngicas, células bacterianas o microorganismos, incluidos parásitos. Los ejemplos de células sanguíneas incluyen eritrocitos y leucocitos. En algunas variaciones, los leucocitos pueden ser neutrófilos.

En diversas realizaciones, los microorganismos pueden incluir bacterias, hongos, algas y protozoos. En un aspecto, los microorganismos son bacterias. Los microorganismos pueden ser patógenos para seres humanos y animales. Los microorganismos adecuados incluyen cualquiera de los bien establecidos en el arte médico y los nuevos agentes patógenos y variantes que surgen de vez en cuando. Los ejemplos de bacterias conocidas hoy día incluyen, pero sin limitación, géneros tales como *Bacillus*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Bordetella*, *Treponema*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Moraxella*, *Morganella* y otros patógenos humanos que se encuentran en la práctica médica. En los géneros están incluidas diversas especies. Por ejemplo, *Klebsiella* incluye, pero sin limitación, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* y *Klebsiella ornithinolytica*. Los ejemplos de virus incluyen viroides.

Análogamente, los microorganismos pueden comprender hongos seleccionados de géneros tales como *Candida*, *Aspergillus* y otros patógenos humanos que se encuentran en la práctica médica. Los virus pueden ser, pero sin limitación, ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), paramixovirus (por ejemplo, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, virus del sarampión), adenovirus, rinovirus, coronavirus, reovirus, togavirus (por ejemplo, virus de la rubéola), parvovirus, poxvirus (por ejemplo virus de la viruela, virus de la vacuna), enterovirus (por ejemplo poliovirus, coxsackievirus), virus de la hepatitis (incluidas hepatitis A, B y C), herpesvirus (por ejemplo virus de herpes simple, virus de la varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), rotavirus, virus de Norwalk, hantavirus, arenavirus, rabdovirus (por ejemplo virus de la rabia), retrovirus (incluidos VIH, HTLV I e II), papovavirus (por ejemplo virus del papiloma), poliomavirus y picornavirus, y similares.

Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria pueden utilizarse para identificar células hospedadoras que alberguen virus. Primeramente se purifican las células, y posteriormente se manipulan las células para, o bien producir virus, o bien identificar ácidos nucleicos en las células.

La muestra se puede obtener de cualquier número de fuentes, entre ellas, pero sin limitación, fluidos corporales (que incluyen, pero sin limitación, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor, líquido peritoneal, líquido pleural, efusiones, ascitis y secreciones purulentas, líquidos de lavado, fluidos drenados, muestras de citología por raspado, tejido de biopsia, dispositivos médicos explantados, catéteres infectados, pus, biopelículas y semen) de prácticamente cualquier organismo, con inclusión de muestras de mamíferos y muestras humanas, así como muestras medioambientales (entre ellas, pero sin limitación, muestras de aire, agrícolas, de agua y de suelo). Además, se pueden tomar muestras de la elaboración de alimentos, que pueden incluir tanto muestras de entrada (por ejemplo de cereales, leche o canales de animales), muestras en pasos intermedios de la elaboración, así como alimentos terminados listos para el consumidor. El método se puede utilizar para aplicaciones veterinarias. Los métodos también se pueden utilizar para el análisis de la leche en el diagnóstico y tratamiento de mastitis, y el análisis de muestras respiratorias para el diagnóstico de enfermedad respiratoria bovina. Además, los métodos permiten la detección rápida de la presencia de posibles agentes de guerra biológica en una muestra.

Las muestras pueden variar desde menos de un mililitro hasta un litro para ciertos fluidos de lavado respiratorio, y pueden abarcar también, en concentración bacteriana, desde menos de una bacteria hasta más de 10^9 bacterias por mililitro. Además, la muestra puede presentarse en sangre, orina, esputo, líquido de lavado u otro medio. Se puede concentrar la muestra antes de utilizar los métodos descritos para purificar las células y/o los virus de la muestra. La concentración de la muestra concentra la muestra con el fin de que las bacterias que están presentes en pequeño número puedan ser introducidas eficazmente en el sistema y muestreadas adecuadamente, y también para que se pueda normalizar el medio líquido de base, o en algunos casos eliminarlo o reducirlo, con el fin de tener

propiedades consistentes al introducirla al sistema. La concentración de la muestra puede realizarse mediante centrifugación, combinación de muestras, eliminación de disolventes, y similares. Cabe señalar, sin embargo, que ciertas muestras citadas en la descripción se pueden utilizar sin concentración ni otra modificación.

- 5 La detección rápida de diversas células y/o virus es útil para un paciente que padezca diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, la neumonía puede ser consecuencia de una diversidad de causas, entre ellas la infección con bacterias, virus, hongos o parásitos, así como una lesión química o física de los pulmones. Sin embargo, algunas muestras de células y/o virus contienen contaminantes que interfieren con su detección. La purificación de un microorganismo (o virus u otra célula), y la detección del tipo y cantidad de un microorganismo (o virus u otra célula) presente en una muestra, son útiles para diagnosticar y tratar con eficacia a un paciente.
- 10 En otras realizaciones, se lisan selectivamente las células. Por ejemplo, en el caso de dianas intracelulares, se pueden lisar las células de mamífero, liberando microorganismos intracelulares antes de, durante o después de la purificación descrita en la presente memoria.

Contaminantes

- 15 Se eliminan contaminantes de la muestra hacia el medio. Los contaminantes que pueden ser eliminados incluyen especies iónicas, entre ellas, pero sin limitación, cationes y aniones mono o divalentes, materiales intracelulares liberados, fosfolípidos, proteínas extracelulares, mucinas, tensioactivos pulmonares, tapones de moco, pus, glicoproteínas y ácidos nucleicos. La eliminación de contaminantes evita otros pasos de preparación, que requieren mucho tiempo, tales como agitación con vórtice y centrifugación. En varios aspectos, los contaminantes eliminados interfieren con la inmovilización superficial, detección y obtención de imágenes de células y/o virus. Las células y/o los virus quedan en el pocillo, y se pueden recuperar. En ciertos aspectos de los métodos de purificación, no se eliminan de la muestra algunos componentes, como fragmentos de membranas celulares y fragmentos celulares de mayor tamaño.
- 20

Medio

- 25 También se pueden utilizar como medio organogeles, xerogeles y aerogeles. Los aerogeles incluyen, pero sin limitación, aerogel de sílice, aerogeles de carbono, alúmina, cadmio y aerogeles de seleniuro. Los aerogeles orgánicos, como SEAgel, están hechos de agar. También pueden ser útiles aerogeles hechos de calcógenos tales como azufre, selenio y otros elementos.

- 30 En diversas realizaciones, el medio es un hidrogel. En algunas realizaciones, los hidrogeles son una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas. Los hidrogeles pueden ser polímeros naturales o sintéticos sumamente absorbentes, y en algunos casos pueden contener más de 99% de agua. En general, los hidrogeles son medios sólidos, aunque porosos.

- 35 La concentración del hidrogel afecta a la velocidad de migración de los contaminantes a través del hidrogel. El aumento de la concentración del hidrogel reduce el tamaño de poro dentro del hidrogel. Además, los contaminantes con moléculas más pequeñas se mueven más rápido y migran más lejos que contaminantes con moléculas de mayor tamaño.

- 40 La carga del hidrogel también afecta a la velocidad de migración de los contaminantes a través del hidrogel. Cada molécula contaminante migra al electrodo que lleva una carga opuesta a la de la molécula contaminante. La mayoría de los materiales biológicos tienen una carga superficial neta negativa. Algunos tienen una carga neta positiva si el material tiene un exceso de aminas u otros restos positivamente cargados expuestos en la superficie. Se considera neutra la carga si existe un equilibrio entre positivo y negativo, o no cargado, como ocurre en complejos revestidos con materiales neutros que rodean y aíslan en su interior materiales cargados. El material no cargado migrará en la dirección del flujo electroosmótico, en caso de existir.

- 45 El pH del hidrogel también afecta a la velocidad de migración de los contaminantes y las dianas. En algunas realizaciones, se selecciona el pH para incrementar la movilidad de los contaminantes con relación a las células y/o los virus. En algunas realizaciones, se puede seleccionar un pH de manera que las células y/o los virus estén sustancialmente próximos al punto isoelectrico, minimizando la movilidad relativa de células y/o virus con relación a los contaminantes. En otras realizaciones, se puede seleccionar el pH para que sea sustancialmente distinto del punto isoelectrico, de manera que la dirección de la movilidad de células y/o virus se invierta con relación a los contaminantes.

- 50 En algunas realizaciones, un medio contiene nutrientes que favorecen la viabilidad de las células y/o los virus.

Los medios utilizados en los sistemas descritos pueden separar moléculas contaminantes en base a su tamaño y su carga.

La porosidad del hidrogel está directamente relacionada con la concentración de agarosa en el medio. Se pueden elegir diversos niveles de viscosidad eficaz, dependiendo de los objetivos experimentales.

- Son ejemplos de hidrogeles los alginatos, como se describe en Gadkari, 2007, "Optimal hydrogels for fast and safe delivery of bioactive compounds", tesis de la Universidad de Drexel; copolímero de etileno-acetato de vinilo como se describe en la patente de EE.UU. nº 3.854.480; ésteres de ácido hidantoico como se describe en la patente de EE.UU. nº 3.792.081, poliéster de olefina saturado 500-8.000, polietilenglicol (PEG) 200-1.500, copolímero de etileno-acetato de vinilo con 20-40% de acetato de vinilo (20-30k), polietileno clorado con 25-45% de Cl⁻ (20-30k), copolímero de etileno-acrilato de etilo con 20-40% de acrilato de etilo (20-30k) y copolímero de etileno y cloruro de vinilo con 25-45% de Cl⁻ (20-30k) como se describe en la patente de EE.UU. nº 3.938.515; copolímero de metacrilato de metilo y copolímero de metacrilato de glicerilo como se describe en la patente de EE.UU. nº 3.957.362; copolímero de etileno-acetato de vinilo con 4-80% de acetato de vinilo (20-30k) como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.069.307; polisiloxanos como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.136.250; copolímero de acrilato de dihidroxialquilo hidrófilo e insoluble como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.267.295; triacetato de celulosa como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.220.152; acrilamida, vinilpirrolidona y óxido de polietileno-diol como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.423.099; homopolímeros y copolímeros de poliaminoácido como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.351.337; copolímero de poli(ácido glutámico)-glutamato de etilo (5-50% de ácido glutámico, 80-500 kDa) como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.450.150; copolímero termoendurecible de polioxietileno-polioxipropileno como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.478.822; copolímeros vinílicos reticulados de ésteres monoolefinicos insolubles y solubles como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.548.990; copolímeros con N-vinil-2-pirrolidona y metacrilatos como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.693.884; polianhídridos como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.657.543; copolímeros de poli(óxido de alquileo) y éster cíclico de alfa-hidroxiácido (glicolida) como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.882.168; copolímero de poliacrilonitrilo-ácido nítrico como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.218.039; copolímero de metacrilato de N-morfolinoetilo y metacrilato de 2-hidroxietilo como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.857.313; copolímeros reticulados de vinilpirrolidona y alilamina como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.772.484; poliacetales solubles en agua que tienen pesos moleculares de aproximadamente 5.000-30.000 como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.713.441; hidrogeles termoplásticos de polivinilpirrolidona (PVP) y poli(acetato de vinilo) (PVA) y gelatina como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.002.792; ácido algínico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido péctico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido hialurónico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido poliglucurónico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido polimanurónico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido poligalacturónico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, ácido poliarabínico con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺ y kappa-carragenano con Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Zn⁺⁺, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.089.606; polifosfacenos de cadena lateral cargada con reticulación por Ca⁺⁺ como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.149.543; carboximetilcelulosa como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.208.037; agarosa como se describe en la patente de EE.UU. nº 3.961.628; poliacrilamida como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.391.937; Pluronic 127, N-isopropilacrilamida (NIPAM); y mezclas (copolímeros de bloque, etc.) de todos los hidrogeles enumerados en lo que antecede.
- La agarosa es un polímero lineal, formado por la unidad monomérica repetida de agarobiosa. La agarobiosa es un disacárido formado por D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactopiranos. Se pueden utilizar como hidrogel pectina de agarosa o agarosa sulfonada. Se puede obtener agarosa de Lonza (Rockland, ME) bajo el nombre de marca SeaKem™. En ciertas realizaciones, la concentración del gel de agarosa para eliminar eficazmente los contaminantes se sitúa en 0,1-2,0% peso/volumen.
- Se pueden adquirir hidrogeles de agarosa purificados para su uso en el método descrito. Un ejemplo de un hidrogel purificado comercial se puede conseguir de Invitrogen (Carlsbad, CA) bajo el nombre de marca E-Gel® EX Starter.
- La poliacrilamida es un polímero (-CH₂CHCONH₂-) formado a partir de subunidades de acrilamida. Se puede sintetizar como una estructura de cadena lineal simple o reticulada, típicamente utilizando N,N'-metilenbisacrilamida. En la forma reticulada, la poliacrilamida es sumamente hidroabsorbente, formando un gel blando. Se puede obtener poliacrilamida de BioRad (Hercules, CA).
- Se pueden adquirir hidrogeles de poliacrilamida purificados, para su uso en el método descrito. Un ejemplo de un hidrogel comercial purificado se puede obtener de BioRad (Hercules, CA).
- Se puede realizar el preacondicionamiento de un medio. A menudo se realiza el preacondicionamiento de un medio para eliminar impurezas que se encuentran en el medio. Por ejemplo, la aplicación de un potencial a través de un hidrogel ayuda a que impurezas móviles migren fuera del hidrogel. El potencial puede ser, por ejemplo, 50 V, 75 V, 100 V, 150 V, 200 V, 250 V, 300 V, 350 V, 400 V o 500 V. En diversas realizaciones, se puede aplicar el potencial durante un período de tiempo, como al menos 2 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 60 minutos, al menos 120 minutos o al menos 180 minutos.
- En diversas realizaciones, el medio puede ser un filtro. Los ejemplos de filtros incluyen los disponibles de Pall Corporation (Port Washington, NY), tales como polipropileno hidrófilo, un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; politetrafluoroetileno (PTFE), un material hidrófobo, de alta captación, con tamaños de poro de 0,2 µm, 0,45 µm, 1 µm, 2 µm y 3 µm; fibra de vidrio, un material hidrófilo, de captación moderada, con un tamaño de poro de 1 µm; nailon, un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; poli(fluoruro de vinilideno) PVDF, un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; PES (Supor), un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,1 µm, 0,2 µm,

0,45 µm y 0,8 µm; copolímero vinílico/acrílico, un material hidrófobo que se puede utilizar para muestreo del aire y tiene tamaños de poro de 0,45 µm y 0,8 µm; poli(cloruro de vinilo) (PVC), que también se puede utilizar para muestreo del aire y tiene tamaños de poro de 5 µm; ésteres mixtos de celulosa hidrófilos, un material de alta captación con un tamaño de poro de 0,45 µm; copolímero acrílico hidrófilo, que se puede utilizar como prefiltro sobre un soporte y tiene tamaños de poro de 0,2 µm, 0,45 µm, 0,8 µm, 1,2 µm, 3 µm y 5 µm; y nitrocelulosa, un material de alta captación con un tamaño de poro de 0,2 µm. Los ejemplos de filtros disponibles de Millipore (Billerica, MA) incluyen PTFE (LCR), un material hidrófilo, de moderada captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; PVDF (Durapore), un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; PTFE (Fluoropore), un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; nailon, un material hidrófilo, de baja captación, con tamaños de poro de 0,2 µm y 0,45 µm; fibra de vidrio, un material hidrófilo, de captación moderada, con un tamaño de poro de 1 µm; y ésteres mixtos de celulosa hidrófilos, un material de alta captación, con tamaños de poro ilustrativos de 0,2 µm, 0,45 µm y 0,8 µm. Los filtros pueden tener tamaños de poro mayores o iguales que aproximadamente 0,01 µm, 0,05 µm o 0,1 µm, 0,2 µm, 0,4 µm, 0,6 µm, 0,8 µm, 1,0 µm, 1,5 µm, 2,0 µm, 2,5 µm, 3,0 µm, 4,0 µm o 5,0 µm. Los filtros pueden tener tamaños de poro menores o iguales que aproximadamente 5,0 µm, 4,0 µm, 3,0 µm, 2,5 µm, 2,0 µm, 1,5 µm, 1,0 µm, 0,8 µm, 0,6 µm, 0,4 µm, 0,2 µm, 0,05 µm o 0,01 µm.

En diversas realizaciones el método incluye añadir un agente químico al medio para aumentar la permeabilidad del medio y/o aumentar la capacidad del contaminante para penetrar en el medio.

Los ejemplos de agentes químicos incluyen agentes reductores, entre ellos, pero sin limitación, agentes reductores de ditiotreitól (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y mercaptoetanol; agentes desnaturalizantes que emplean tensioactivos, entre ellos, pero sin limitación, laurilsulfatos de sodio, tensioactivos no iónicos tales como Triton X-100, Tween-20, o agentes caotrópicos, entre ellos, pero sin limitación, urea, tiourea o cloruro de guanidinio; agentes quelantes que pueden coordinar moléculas tales como calcio, magnesio y otros iones divalentes y trivalentes (incluidos iones metálicos), entre ellos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido etilenglicoltetraacético (EGTA); agentes de escisión que incluyen proteasas, nucleasas, gliconasas, lipasas; y excipientes tales como polietilenglicol. En algunas realizaciones se puede utilizar una combinación de uno o más agentes químicos.

Los geles viscosos incluyen éteres de celulosa (tales como hidroxietilcelulosa o Methocel™ (Dow (Midland, MI)) y polímeros solubles modificadores de la viscosidad (tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, dextranos, tensioactivos plurónicos y alginatos). En un gel viscoso, el tamaño de poro no está definido. La separación se basa en el flujo retardado de las células en el medio viscoso.

En algunas realizaciones, se pueden añadir agentes al medio o bien utilizarlos para tratar el medio con el objeto de controlar el flujo electroosmótico. En algunas realizaciones, puede ser deseable incrementar o reducir el flujo electroosmótico.

Mezcla de muestras

Para analizar una muestra representativa, la muestra debe ser sustancialmente uniforme. En algunas realizaciones, la homogeneización de una muestra se puede lograr mediante un paso de mezcladura o agitación de la muestra. Mezclar la muestra consigue suspender nuevamente cualquier material apelmazado formado en las paredes del pocillo.

En diversas realizaciones, el método incluye mezclar una muestra utilizando una punta de pipeta. Véase, por ejemplo, la punta 228 de pipeta en la Figura 2A. Se hace pasar la muestra a través de la estrecha abertura de la pipeta para someter a cizalladura y homogeneizar la muestra.

Soluciones tampón

En diversas realizaciones, el método incluye poner un tampón en contacto con el medio.

En algunas realizaciones, los parámetros de mezcladura del tampón están diseñados para maximizar la eliminación de restos y material no diana.

En algunas realizaciones, se puede reponer el tampón para evitar la acumulación de productos de electroforesis indeseables. Por ejemplo, mediante la reposición o sustitución del tampón, eventualmente con uso de flujo continuo, se pueden minimizar sustancialmente efectos indeseables de gradientes de pH generados en el cátodo y el ánodo, y en proximidades de la muestra.

En diversas realizaciones, los tampones electroforéticos utilizan pares de mediadores redox. En ciertas realizaciones, estos mediadores redox facilitan la electroforesis a baja tensión que permite mantener la viabilidad de las células. Estos mediadores redox pueden permitir también el uso de materiales de electrodos que tienen una utilidad limitada en la electroforesis a alta tensión (por ejemplo, óxido de indio y estaño, electrodos "ITO", por sus siglas en inglés). Además, estos mediadores redox encuentran uso en "sistemas cerrados", por ejemplo sistemas no abiertos a la atmósfera. En sistemas cerrados se evita la formación de burbujas y la generación de otras especies reactivas durante la operación de electroforesis, que pueden originar una serie de problemas, y los sistemas

cerrados también ayudan a prevenir la exposición del técnico a muestras potencialmente infecciosas, así como a reducir problemas asociados con la eliminación de muestras biológicas como residuo.

En algunas realizaciones, el tampón está situado en un depósito en contacto con el medio. En diversas realizaciones, el medio no está sumergido en el tampón.

- 5 Los tampones incluyen, por ejemplo, diversos tampones para electroforesis, entre ellos tampones zwitteriónicos, tampones neutros tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), tampones de pH inferior o superior, y tampones hipotónicos o hipertónicos. En algunas realizaciones, se incluyen borato y otros iones y contraiones seleccionados, para facilitar una electroforesis eficaz.

- 10 En algunas realizaciones, la solución tampón incluye histidina y tris(hidroximetil)aminometano. La histidina tiene baja conductividad. El tris(hidroximetil)aminometano tiene cierta conductividad, pero tiene baja movilidad. La histidina tiene valores de pKa cercanos a los valores fisiológicos, lo que proporciona capacidad de amortiguación adecuada. Se puede obtener tris(hidroximetil)aminometano de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) como Trizma® base (Sigma, T1503).

- 15 En algunas realizaciones, se desala la muestra (en NaCl 150 mM) para eliminar especies catiónicas y aniónicas que puedan interferir con el análisis posterior. En algunas realizaciones, la desalación permite una concentración y captura satisfactorias del microorganismo.

- 20 La movilidad electroforética puede ser dependiente del tampón debido a la variabilidad del potencial zeta con la concentración salina, la valencia de las sales presentes en el tampón y el pH de la muestra. Las bacterias pueden perder carga a medida que aumenta la concentración salina o a medida que se reduce el pH por debajo de un cierto pH, por ejemplo pH 5,0. Las sales divalentes y trivalentes son inactivadores más eficaces que las sales monovalentes. Por ejemplo, CaCl_2 es más eficaz que NaCl para inactivar una carga. Se pueden utilizar ciertos agentes como los quelantes, entre ellos, pero sin limitación, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), ambos disponibles de Sigma-Aldrich, para controlar la concentración de especies cargadas en la muestra.

- 25 Pocillos

- Como se expone en la Figura 2A, se pueden formar en el medio uno o una pluralidad de pocillos. Los pocillos se moldean en el gel. Por ejemplo, para crear la forma de pocillo apropiada se puede utilizar un peine formador de pocillos personalizado. Los pocillos incluyen paredes laterales que pueden ser sustancialmente verticales o diagonales. En diversas realizaciones, el método incluye pocillos que no tienen forma rectangular. En diversas realizaciones, los pocillos están sustancialmente achaflanados para eliminar bordes agudos en el pocillo, mejorando así la recuperación de diana. En algunas realizaciones, los pocillos pueden acoger diversos tamaños de muestra. En diversas realizaciones, los pocillos pueden acoger de 10 μL a 500 μL . En algunas realizaciones, los pocillos tienen de 5 a 250 mm de ancho. Para una muestra se pueden utilizar múltiples pocillos. Tal como se ilustra en la Figura 8, un pocillo 822 en medio 820 puede ser circular, rodeando un electrodo tal como el cátodo 804, y los contraelectrodos pueden rodear el pocillo, tal como el anillo anódico 802 ilustrado. En una configuración de pocillo circular, una muestra colocada en el pocillo 822 rodea al cátodo 804. En una realización semejante, puede correr sobre el cátodo 804 una cortina de tampón de desarrollo, al objeto de eliminar subproductos de electrodo durante la electroforesis.

- La Figura 3 representa una vista lateral de una realización de un peine 300 formador de pocillos personalizado. Un cuerpo 302 de peine tiene una pluralidad de dientes 304 formadores de pocillos conectados al cuerpo 302 del peine por un borde 306. Los lados de los dientes 308 forman las paredes laterales de los pocillos de forma no rectangular en un medio. En esta realización, los pocillos tienen forma triangular. El peine 300 está dimensionado y configurado para concordar con el medio del casete, como el mostrado en la Figura 2A. En esta realización, el peine 300 tiene seis dientes 304 formadores de pocillos, pero podría tener más o menos dientes dependiendo del tamaño del casete.

- En un pocillo con fondo rectangular o cuadrado, la solución de la muestra puede escalar por capilaridad las paredes del pocillo. En un pocillo de forma triangular, la solución de muestra no tiene una tendencia tan fuerte a escalar las paredes por capilaridad, por lo que es más fácil extraer el microorganismo del pocillo. En algunas realizaciones, el pocillo de forma triangular tiene su menor anchura en el fondo y su mayor anchura en la parte superior del pocillo. Los dientes 304 formadores de pocillos mostrados en la Figura 3 crean un patrón de pocillos de forma triangular en el medio. En otras realizaciones, los pocillos pueden ser pocillos con fondo redondo.

- Las muestras pueden tener alto contenido de sólidos (por ejemplo, de 1% - 50% peso/volumen de componentes sólidos). La reducción al mínimo de la anchura del pocillo minimiza el apelmazamiento de los sólidos en las paredes del pocillo. En algunas realizaciones, el pocillo tiene una anchura de 0,0635 mm (0,0025 pulgadas) en su punto más ancho.

Cámaras

En diversas realizaciones, el método utiliza un sistema 900 en donde pueden estar formadas en un medio 920 una o una pluralidad de cámaras 953. Las cámaras 953 están moldeadas en el gel 920 y tienen una orificio de entrada y uno de salida (954 y 955) como se expone en la Figura 9. Los orificios de entrada y de salida 954 y 955 están conectados por el tubo 956 con el fin de hacer circular una muestra a través de una cámara 953, por ejemplo mediante una bomba peristáltica. Las cámaras pueden estar sumergidas o parcialmente sumergidas en tampón, y se aplica potencial eléctrico al sistema ortogonalmente a la dirección del flujo de circulación de la muestra.

Electrodos

En diversas realizaciones del método, pueden estar contenidos dentro del pocillo o cámara un electrodo o una pluralidad de electrodos. Además, en diversas realizaciones, el electrodo o pluralidad de electrodos pueden estar en contacto con el medio o bien estar separados a una distancia del medio. El electrodo o pluralidad de electrodos pueden estar conectados al medio mediante puentes salinos, tampón, mediadores redox u otros métodos de transferencia de carga por conducción utilizados por los expertos en la técnica o quienes están familiarizados con las técnicas utilizadas en aplicaciones para el establecimiento de corriente farádica. En algunas realizaciones, los electrodos están en contacto físico con las paredes de cámara.

En diversas realizaciones, se pueden utilizar materiales conductores para distorsionar el campo eléctrico, dando lugar a la concentración localizada de células y/o virus. La distorsión del campo eléctrico puede aprovechar diferencias de conductividad de los materiales para llevar a cabo dicha localización.

Inmovilización de las células y/o los virus

En diversas realizaciones, el método incluye la inmovilización del microorganismo. Células y/o los virus son inmovilizados por diversos filtros que impiden que las dianas (el microorganismo) atraviesen, por ejemplo, las paredes de tubos, microcanales (horizontales o verticales) o cualquier geometría que emplee una superficie de captura (específica o no específica), laberintos, espacio fluido muerto (canales ciegos de remolino) y micropocillos de escala aproximadamente celular.

Superficie de detección

En algunas realizaciones, el método incluye la inmovilización de células y/o virus sobre una superficie cargada positivamente. Por ejemplo, una superficie de detección cargada positivamente puede inmovilizar células y/o virus. En otras realizaciones, se pueden inmovilizar las células y/o los virus por incrustación en el medio.

Se describen superficies de detección, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.844.028. Las superficies de detección pueden incluir las revestidas con poli-L-lisina, polietilenimina u otros polímeros catiónicos. Además, las superficies de detección pueden incluir revestimientos superficiales hidrófobos.

Una vez que el medio ha eliminado los contaminantes de la muestra, un sistema puede detectar el microorganismo. En algunas realizaciones, el sistema es un sistema de detección óptica. En algunas realizaciones, el sistema es un microscopio.

En algunas realizaciones, el sistema es un sistema automatizado.

En diversas realizaciones, el uso secuencial o simultáneo de una pluralidad de electrodos de electroforesis permite la electroforesis multidimensional, es decir, se puede dirigir, "mezclar" o "agitar" la solución en las proximidades de una superficie de detección para aumentar aún más la cinética de captación. Por ejemplo, se pueden invertir las polaridades para permitir que las células y/o los virus que puedan no haber quedado fijados a la superficie de detección viajen de regreso "sobre" la superficie, dando lugar a un incremento de la captación. Además, se pueden colocar los electrodos e invertir la polaridad del campo conforme a una secuencia programada, con el fin de proporcionar agitación en las dos dimensiones de un plano, o bien en tres dimensiones.

Detección del microorganismo

En diversas realizaciones, el método incluye detección del microorganismo. En general, los dispositivos biosensores están diseñados para encajar en una unidad de detección, y generalmente utilizan varios componentes, que pueden ser, o bien "on-chip" ("dentro de la pastilla", por ejemplo siendo parte de un cartucho biosensor), o bien "off-chip" ("fuera de la pastilla", en donde algunos de los componentes son parte de uno o varios dispositivos separados en los cuales encaja el cartucho biosensor). Estos componentes incluyen, pero sin limitación, una superficie de detección o bien una pluralidad (por ejemplo, una matriz) de las mismas, módulos de concentración (que, como se indica a grandes rasgos en la presente memoria, con frecuencia están configurados junto con la superficie o las superficies de detección), módulos de detección (de nuevo, con frecuencia configurados junto con la superficie o las superficies de detección), orificios de entrada y salida, canales, bombas, mezcladores, válvulas, calentadores, depósitos de líquido (incluidos depósitos de muestra, depósitos de reactivo y depósitos de tampón), controladores de concentración (por ejemplo, controladores eléctricos en el caso de la electroforesis) y componentes de recogida y análisis de datos (por ejemplo, un ordenador).

En la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/888.828, presentada el 8 de julio de 2004, concedida como patente de EE.UU. n° 7.687.239, y en la solicitud de EE.UU. n° 11/303.803, presentada el 16 de diciembre 2005, concedida como patente de EE.UU. n° 7.341.841, se describe un ejemplo de un sistema diagnóstico de microorganismos.

Con este método se pueden detectar niveles bajos de células y/o virus. Las células se pueden cuantificar en términos de células por mL, unidades formadoras de colonias (UFC, o unidades) por mL para hongos y/o microorganismos bacterianos, y se pueden cuantificar los virus en partículas por mL o unidades formadoras de placas (UFP) por mL. Los niveles de células y/o virus se describen en unidades por volumen, típicamente por mL de volumen. Los expertos en la técnica entienden las unidades específicas que típicamente se utilizan, según sea adecuado para una diana dada. Con fines ilustrativos, los rangos de concentración que siguen se indican en unidades genéricas por mL. Por ejemplo, se pueden detectar niveles de 0,1 a 1×10^8 unidades/mL. En diversas realizaciones, se pueden detectar células y/o virus a niveles inferiores a 5×10^8 unidades/mL, 3×10^8 unidades/mL, 1×10^8 unidades/mL, $0,8 \times 10^8$ unidades/mL, $0,6 \times 10^8$ unidades/mL, $0,4 \times 10^8$ unidades/mL, $0,2 \times 10^8$ unidades/mL o $0,1 \times 10^8$ unidades/mL.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance. Fácilmente serán evidentes otras variantes para un experto normal en la técnica, y están abarcadas por las reivindicaciones adjuntas.

El ejemplo descrito a continuación admite un amplio margen de variabilidad de espécimen, homogeneizando en primer lugar el espécimen, muestreando después el espécimen, y purificando después la muestra para eliminar restos y otros materiales interferentes, al colocar la muestra en un medio que contiene un pocillo y aplicar un potencial lateralmente a través del medio al objeto de retener células y hacer pasar contaminantes al medio.

Ejemplo 1. Purificación de células bacterianas a partir de especímenes respiratorios

Preparación del gel

Se mezclaron 10 gramos de agarosa en polvo (SeaKem, LE Agarose) con 1 L de solución tamponada que contenía histidina (Sigma, H8000) 100 mM y Trizma® base (Sigma, T1503) 2,5 mM. La concentración final de la suspensión de agarosa era 1,0% (peso/volumen). Se hirvió la solución para fundir la agarosa en polvo, y se guardó la agarosa fundida en forma líquida, a 40°C, hasta su uso.

Vertido del gel

Quienes estén familiarizados con la técnica de la electroforesis en plancha de gel reconocerán que habitualmente se emplean insertos o peines sólidos para crear un volumen vacío en una plancha de gel que posteriormente se utiliza para cargar muestra. En general, los peines para electroforesis en gel tienen nominalmente 1-2 mm de espesor, y son capaces de admitir nominalmente 100 µL de volumen de muestra. En este ejemplo, se utilizó un pocillo con forma de V equilátera, personalizado. El pocillo tenía lados de 1 cm de longitud y un grosor nominal de 0,6 mm (0,025 pulgadas). Se insertó el peine en una cubeta para gel (E-C Apparatus, EC 250-90) y se llenó la cubeta con la agarosa fundida, sumergiendo una parte del peine. Se dejó enfriar la agarosa hasta la temperatura ambiente, formando un gel de agarosa. Se extrajo el peine de la agarosa solidificada, y el volumen vacío del peine formó un pocillo en el material. El pocillo con forma de V permitió una fácil recuperación del volumen de muestra desde el pocillo, como se describe con más detalle a continuación.

Pretratamiento del medio de gel de agarosa

Se colocó en un aparato de electroforesis la cubeta de gel que contenía el medio de gel de agarosa con pocillos triangulares, y después se sumergió en un tampón de desarrollo que contenía histidina 100 mM y Trizma base 2,5 mM. Se aplicó durante 1 hora un potencial de 250 voltios. El potencial aplicado proporcionó 22 mA de corriente. Se retiraron del aparato de electroforesis los geles pretratados, y se trasladaron a un recipiente cerrado y se conservaron hasta su uso sumergidos en tampón de desarrollo fresco.

Homogeneización del espécimen

Se homogeneizó un resto de espécimen que tenía un nivel conocido de bacterias, vertiéndolo en una jeringa conectada a un tubo de PEEK de diámetro interior 0,5 mm (0,02 pulgadas) y forzándolo 10 veces a través del tubo de PEEK con un caudal de aproximadamente 0,1 mL/s, para licuar el espécimen. Después se filtró el espécimen a través de filtros de polycarbonato con escalas grabadas de 5 µm (SPI Pore, E5013-MB). Se trató una alícuota de muestra de 1 mL del espécimen como se describe a continuación. También se reservó como control una alícuota del espécimen.

Se pueden comparar con la muestra desconocida un testigo o una muestra clínica conocida (por ejemplo, con una concentración conocida de bacterias).

Evaluación de la muestra

5 Se diluyó la muestra a una concentración bacteriana nominal final de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. Se sembraron por triplicado 50 μ L de la muestra diluida, en placas de agar Mueller Hinton (MHA, por sus siglas en inglés) y se colocaron en una incubadora durante la noche. El número de colonias contadas en las placas incubadas durante la noche, dividido por el volumen sembrado en placas y multiplicado por el factor de dilución, proporcionó el número real de inicio de bacterias de *Klebsiella oxytoca*, en UFC/ml.

Se diluyó 10 veces la muestra, y se determinó a 625 nm el valor de la densidad óptica a fin de evaluar la cantidad de restos de partículas en la muestra.

Carga de muestra

10 Se colocaron en la cubeta y aparato de gel los geles pretratados, se aplastaron para secarlos, y se eliminó de los pocillos triangulares el exceso de líquido utilizando puntas de pipeta capilares planas, de plástico, de un grosor de 0,2 mm (Fisher 07-200-519). Se llenó el pocillo con una muestra de 20 μ L del espécimen homogeneizado.

Tratamiento de la muestra

15 Se añadió tampón de desarrollo de histidina/Tris al aparato, de modo que el nivel de líquido estaba por debajo de la parte superior de la plancha de gel. Se sometió la muestra a electroforesis durante 5 minutos a 250 voltios y se sometieron a cizalladura hidrodinámica las muestras pipeteando arriba y abajo el volumen 5 veces, utilizando una punta de pipeta capilar. Se sometieron nuevamente las muestras a electroforesis durante 5 minutos a 250 voltios, y a continuación se sometieron a cizalladura hidrodinámica las muestras pipeteando arriba y abajo 5 veces el volumen de muestra, utilizando una punta de pipeta capilar.

Evaluación postratamiento de la muestra adicionada

20 Se diluyó la muestra tratada, hasta una concentración final de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. Se sembraron por triplicado en agar Mueller Hinton (MHA) 50 μ L de la muestra diluida, y se colocaron en una incubadora durante una noche. El número de colonias contadas en las placas incubadas durante la noche, dividido por el volumen sembrado en placas y multiplicado por el factor de dilución proporcionó el número real inicial de bacterias de *Klebsiella oxytoca* recuperadas en UFC/ml.

25 Se diluyó 10 veces la muestra tratada, y después se determinó a 625 nm el valor de la densidad óptica a fin de evaluar la cantidad de restos de partículas que quedaban en la muestra.

Resultados

	Densidad óptica antes del tratamiento (DO)	Densidad óptica después del tratamiento (DO)	Factor de purificación
Método con medio	0,2841	0,065	4,35

Detalles de configuración de electrodo y circuito

30 Se diluyó con 40 μ L de ácido ascórbico 10 mM el volumen de 20 μ L de muestra recuperada, y después se introdujo en una celda de flujo (descrita a continuación) para concentrarla electrocinéticamente.

Con fines de comparación, se diluyó con 40 μ L de ácido ascórbico 10 mM un volumen de 20 μ L de una muestra no tratada, y después se introdujo en una celda de flujo (descrita a continuación) para concentrarla electrocinéticamente.

35 Construcción de la celda de flujo

40 La Figura 4A es una vista en perspectiva de un conjunto 400 de celdas de flujo estratificadas con múltiples celdas de flujo, y la Figura 4B es una vista interior de una celda de flujo individual con correspondientes detalles de electrodos y circuito. Se montaron las celdas de flujo utilizando un conjunto 450 de celda de flujo estratificada troquelada de tres capas (DLE, Oceanside, CA), emparedado entre un suelo 450 de celda de flujo constituido por un portaobjetos de vidrio revestido de óxido de indio y estaño (ITO) (Delta Technology, Stillwater, MN) y un techo 451 de celda de flujo de plástico de poliéster revestido con ITO, de 0,13 mm (5 milésimas de pulgada) (ITO-PET) (Sheldahl, Northfield, MN), formando una cámara de celda de flujo para fluido. El conjunto de celdas de flujo estratificadas contenía 32 canales separados 453, cada uno de 1,78 mm de ancho x 0,30 mm de alto x 11,28 mm de largo, con orificios (454 y 455) de entrada y salida de fluido de 1,78 mm de diámetro para interactuar con puntas de pipeta de plástico con el fin de realizar intercambios de fluido mediante pipetas manuales. La electrodos superior e inferior transparentes permitían la obtención imágenes con microscopio.

Se pusieron en contacto bacterias 401 suspendidas en tampón para electrocinesis (EKB, por sus siglas en inglés) redox-activo, con electrodos uniformemente transparentes contruidos de vidrio revestido con ITO transparente

(Delta Technologies, Stillwater, MN) o película de poliéster (Sheldahl, Northfield, MN). Se aplicó un potencial a las superficies conductoras de ITO completando el circuito, lo que estableció una corriente farádica y un campo eléctrico entre los electrodos y permitió la concentración electrocinética (EKC, por sus siglas en inglés) bacteriana y la inmovilización en la superficie, como se ilustra en la Figura 4B.

5 Experimentos de suspensión bacteriana y concentración superficial

Se realizaron estudios cargando las celdas de flujo con muestras, con la fuente de alimentación apagada, e insertando después las celdas de flujo en la platina del microscopio. El microscopio tomó imágenes de la superficie inferior de la celda de flujo durante los pasos subsiguientes. Se conectó la fuente de alimentación y las células se concentraron electrocinéticamente en la superficie inferior de la celda de flujo por la aplicación de un potencial fijo de 1,4 V de corriente continua. El electrodo superior (techo de la celda de flujo) estaba conectado al terminal negativo de la fuente de alimentación, y el electrodo inferior (suelo de la celda de flujo) estaba conectado al terminal positivo. El potencial aplicado dio como resultado una concentración bacteriana completa en menos de 3 minutos. Después de 300 segundos, se aplicó un potencial fijo de -1,0 V de corriente continua durante 60 segundos más, para medir el grado de fijación irreversible de los restos y bacterias de la muestra al suelo de la celda de flujo. El microscopio digital tomó imágenes durante la concentración cada 3-7 segundos.

Configuración de microscopía digital

Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio invertido Olympus IX-71 equipado con una cámara digital con matriz de CCD monocromo de 12 bits y 1200 x 1600 píxeles (MicroFire, Leeds Precision Instruments, Minneapolis, MN). El cono de iluminación transmitida, creado con un anillo anular IX-PH3 colocado en un condensador de luz transmitida de apertura numérica (AN) 0,55, estaba a 33,4° de la normal al plano focal del microscopio. El cono de iluminación, tras la refracción a través de las interfases aire-vidrio-ITO-líquido de la celda de flujo (que se describe más adelante), dio como resultado un ángulo de incidencia para la dispersión hacia adelante de 24,5° con respecto al plano focal normal. No se calculó el ángulo de incidencia para la dispersión hacia adelante con respecto a las interfases aire-plástico-ITO-líquido de la celda de flujo. En todos los formatos, se obtuvo una imagen oscura en ausencia de dispersores, ya que el cono de iluminación pasaba fuera del cono de obtención de imagen del objetivo, de 20x y AN 0,4, del microscopio (LCPlanFI Olympus, Leeds Precision Instruments). La presencia de dispersores dio lugar a la aparición de objetos brillantes sobre un fondo de imagen oscuro (imagen en campo oscuro para objetos dentro de la profundidad focal). El campo de visión del sistema medía 444 x 592 µm, con una resolución correspondiente de 0,37 µm por píxel. La profundidad de enfoque y la profundidad de imagen del sistema de obtención de imágenes eran 5,8 µm y 3,8 mm, respectivamente. Se mantuvieron una exposición de cámara y ajustes de ganancia constantes cuando se realizaron comparaciones de intensidad relativa, como en el caso de los experimentos de crecimiento que se describen a continuación.

Resultados de acumulación en el tiempo

La Figura 5 es un gráfico que presenta resultados de objetos acumulados en el transcurso del tiempo, para muestras tratadas en comparación con muestras no tratadas. Los datos de la muestra no tratada son los datos esperados.

Los objetos son materiales sólidos, tales como células, virus y restos celulares, que se inmovilizan sobre un superficie muestra. La Figura 5 revela que el material se concentra en la superficie y luego se adhiere a la misma. Se pueden utilizar tratamientos ulteriores, tales como la medición del crecimiento o la tasa de crecimiento, para determinar el número de células viables, y se puede utilizar adicionalmente la exploración del material, utilizando técnicas de fijación de receptor y ligando que incluyen, pero sin limitación, métodos de reconocimiento de anticuerpos o de hibridación de ácido nucleico, para medir la abundancia de microorganismos presentes.

Las Figuras 6A, 6B y 6C representan imágenes microscópicas de muestras no tratadas, en el momento inicial, después de un tiempo de 300 segundos y después de un tiempo de 360 segundos, respectivamente. La tasa de acumulación en la superficie es baja. Como revelan las Figuras 6A, 6B y 6C, se produce una escasa retención superficial de los objetos cuando las muestras no han sido tratadas.

Las Figuras 7A, 7B y 7C representan imágenes microscópicas de muestras tratadas, en el momento inicial, después de un tiempo de 300 segundos y después de un tiempo de 360 segundos, respectivamente. La superficie de la muestra tratada acumula todos los objetos, como se evidencia por una meseta que se produce en menos de 3 minutos. Como revelan las Figuras 7A, 7B y 7C, los objetos estaban irreversiblemente unidos a la superficie, como se evidencia por los consistentes recuentos acumulados durante la electroforesis inversa.

Crecimiento bacteriano

Después de la inmovilización celular, se enjuagó la celda de flujo con 10 veces el volumen interno de la célula de medio de cultivo Mueller-Hinton de composición catiónica ajustada (CAMHB, por sus siglas en inglés) a 1/10 de concentración (Difco, Sparks, MD). Se cargaron en la celda de flujo 100 µL de agar de Mueller Hinton (MHA) licuado, y después se enfrió hasta la temperatura ambiente, solidificándose para dar un hidrogel.

Obtención de imágenes en lapso de tiempo

Se realizó la observación directa del crecimiento bacteriano insertando el conjunto desechable de celda de flujo de 32 canales en un instrumento automatizado de sobremesa personalizado que combinaba microscopía digital, control de movimiento y software para análisis de imagen. El sistema estaba encerrado en una incubadora mantenida a 35°C. La platina motorizada del microscopio permitía traslación XY automatizada, registro de ubicación y memoria con repetibilidad de 10 µm. El sistema enfocaba automáticamente y tomaba imágenes de la superficie de bacterias adherentes, a intervalos de tiempo programados, para múltiples campos de visión durante un experimento. El sistema utilizaba las marcas fiduciales para autoenfocar y alinear mecánicamente (± 1 pixel) los campos de visión antes de la toma de la imagen. Salvo que se indique otra cosa, un único campo de visión contenía un número de células suficiente para el análisis, y rutinas automatizadas de análisis contaban el número de clones en crecimiento.

Resultados de crecimiento

Se comparó el número de clones en crecimiento, observados mediante el uso del método de microscopía digital, con el número de clones en crecimiento esperados, suponiendo un rendimiento del 100% y una correlación 1 a 1 entre colonias en crecimiento sobre placas MHA, para calcular la eficacia del método de microscopía digital. Se comparó el método con medio frente a un método con medio alternativo en el cual el gel estaba sumergido. Se calculó la eficacia total multiplicando la recuperación del tratamiento y la eficacia de la microscopía digital.

	Recuperación tras el tratamiento	Eficacia de la microscopía digital	Eficacia total
Testigo - sin preparación	100%	12%	12%
Método con medio	82%	90%	74%
Método con medio sumergido	43%	100%	43%

La eficacia total para el método con medio fue máxima cuando la plancha de gel no estaba sumergida.

Todas las referencias direccionales (por ejemplo, proximal, distal, superior, inferior, arriba, abajo, izquierda, derecha, lateral, frontal, trasero, parte superior, parte inferior, encima, debajo, vertical, horizontal, en sentido horario y en sentido antihorario) se emplean solo con fines de identificación, para ayudar a que el lector entienda la presente invención, y no crean limitaciones, en particular en cuanto a la posición, orientación o uso de la invención. Las referencias de conexión (por ejemplo, enganchado, acoplado, conectado y unido) se deben interpretar en sentido amplio, y pueden incluir elementos intermedios entre una colección de elementos y movimiento relativo entre los elementos, salvo que se indique otra cosa. En sí, las referencias de conexión no implican necesariamente que dos elementos están directamente conectados y en relación fija mutua. Los dibujos ilustrativos tienen solo finalidad ilustrativa y las dimensiones, posiciones, orden y tamaños relativos reflejados en los dibujos adjuntos pueden variar.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar al menos uno de células y virus en una muestra, que comprende:
añadir la muestra a un pocillo dispuesto en un medio;
aplicar un potencial eléctrico a través del medio para hacer que penetren contaminantes en dicho medio a través de una o más paredes de dicho pocillo al tiempo que se retiene en dicho pocillo el al menos uno de células y virus; y
extraer el al menos uno de células y virus de dicho pocillo.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dichas células son microorganismos.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho medio es uno de un filtro o un hidrogel.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende poner un tampón en contacto con dicho medio.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además inmovilizar el al menos uno de células y virus.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el al menos uno de células y virus está inmovilizado sobre una superficie cargada positivamente.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además detectar el al menos uno de células y virus.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además añadir un agente químico a la muestra para aumentar una permeabilidad del medio a los contaminantes.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además aplicar un flujo tangencial al medio para eliminar contaminantes no permeables de la superficie del medio.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el potencial es uno de un potencial alternante asimétrico o un potencial constante.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además invertir el potencial eléctrico para desplazar el al menos uno de células y virus de la superficie del medio.
12. El método según la reivindicación 11, en donde la aplicación del potencial eléctrico y la inversión del potencial eléctrico se realizan de forma iterativa.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde se conmuta una polaridad de campo conforme a una secuencia programada.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde extraer el al menos uno de células y virus del pocillo comprende extraer al menos una parte del medio que incluye una pared del pocillo que tiene el al menos uno de células y virus acumulado sobre la misma.
15. El método según la reivindicación 14, que comprende además fijar la parte del medio para teñir o extraer muestras moleculares para análisis.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además proporcionar un dispositivo localizador, en donde el dispositivo localizador atrae al menos uno de células y virus a una ubicación discreta en el pocillo, localizando así el al menos uno de células y virus, y en donde el dispositivo localizador se selecciona de uno de un material no conductor, un material conductor y un sistema de tampón discontinuo.

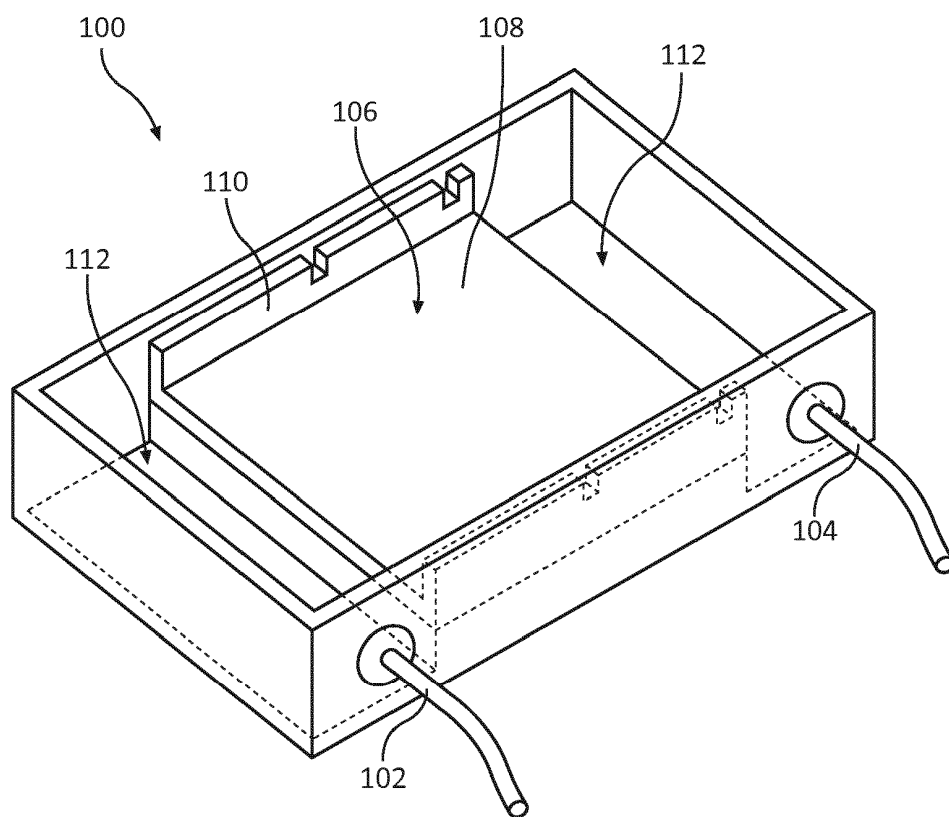


FIG. 1

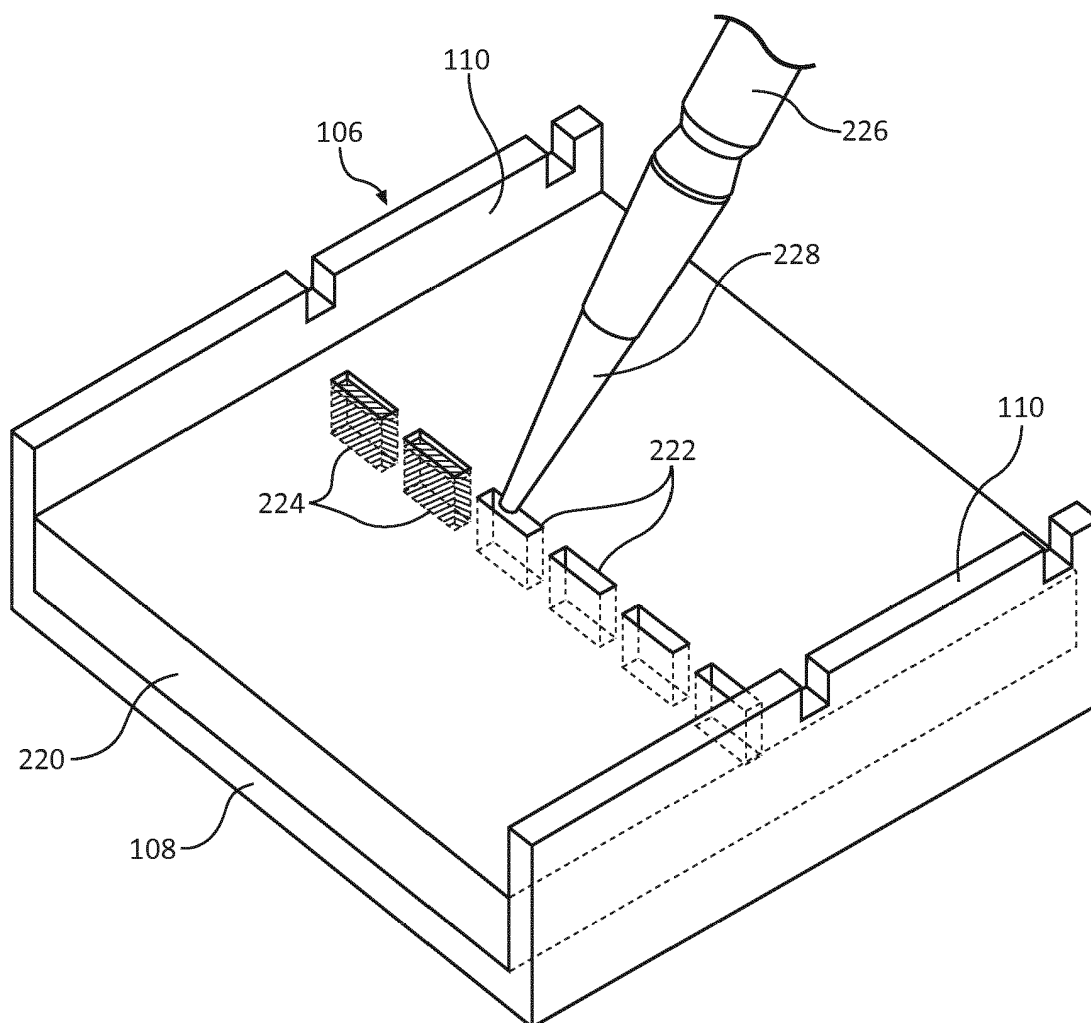


FIG. 2A

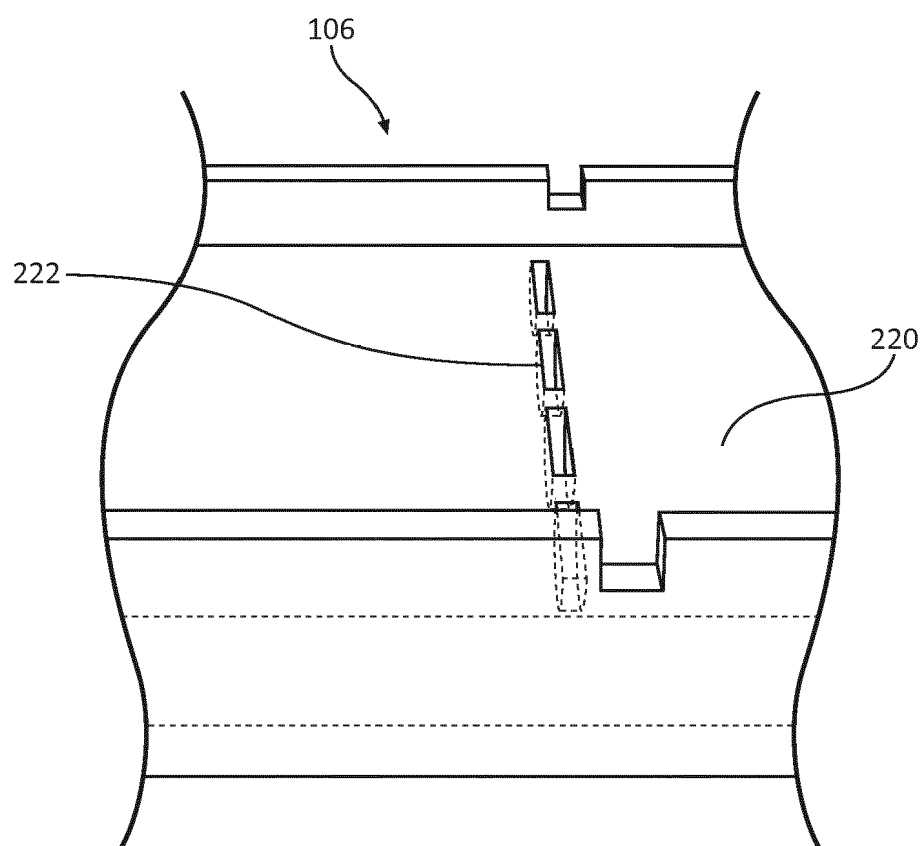


FIG. 2B

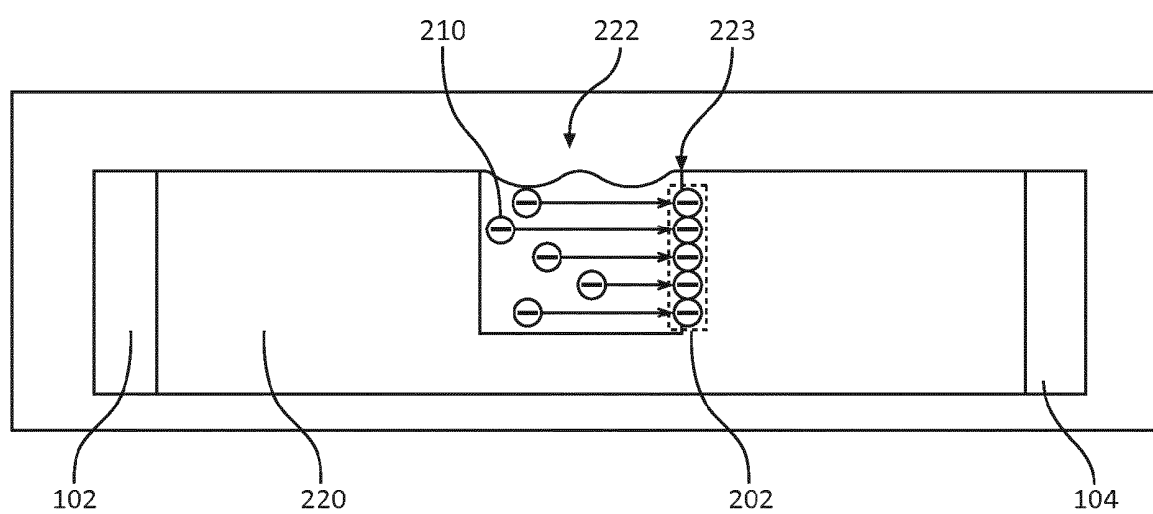


FIG. 2C

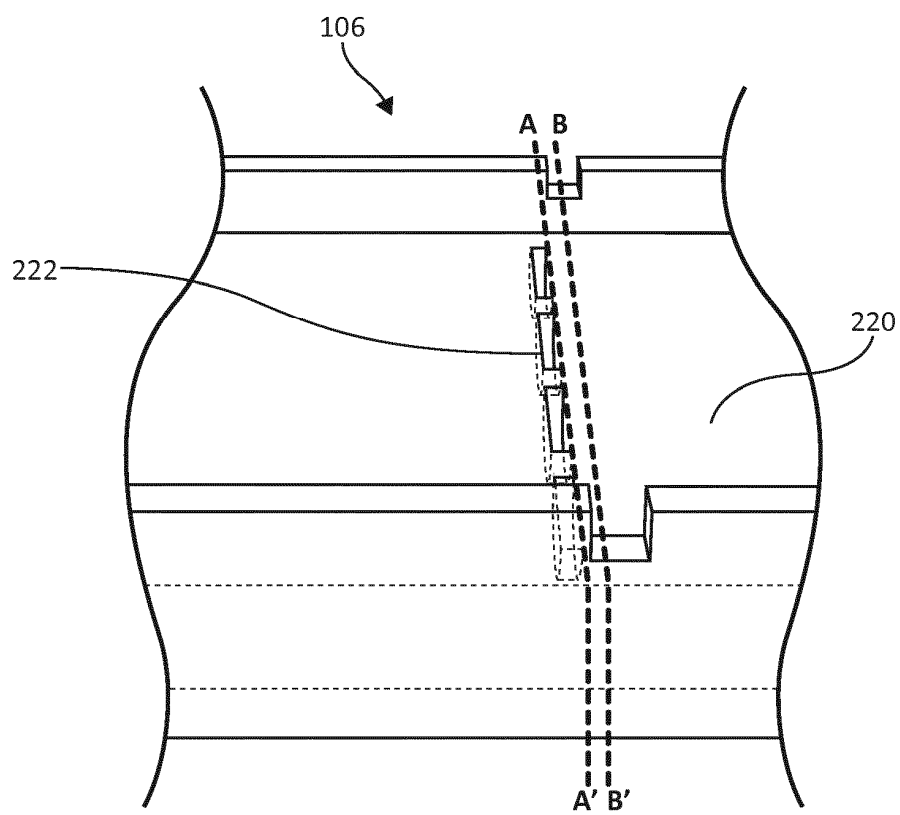


FIG.2D

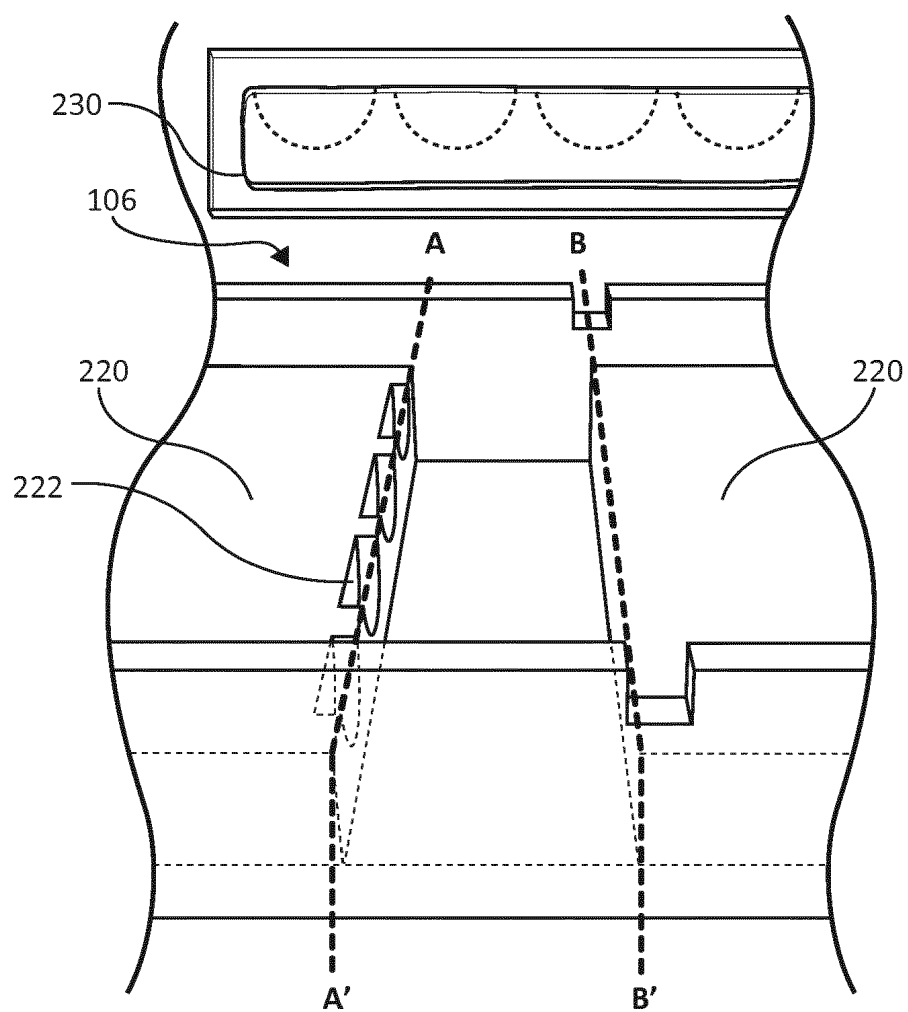


FIG. 2E

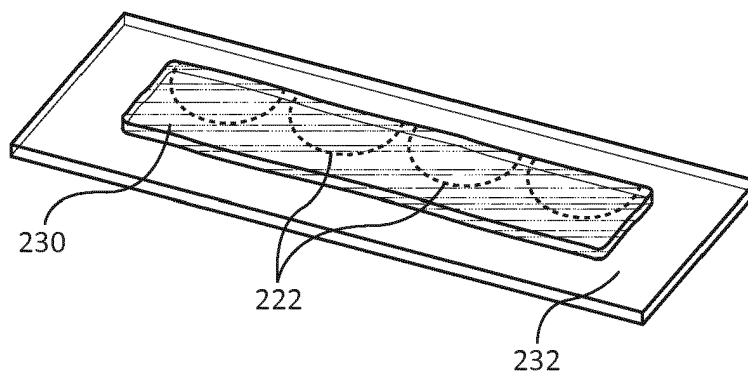


FIG. 2F

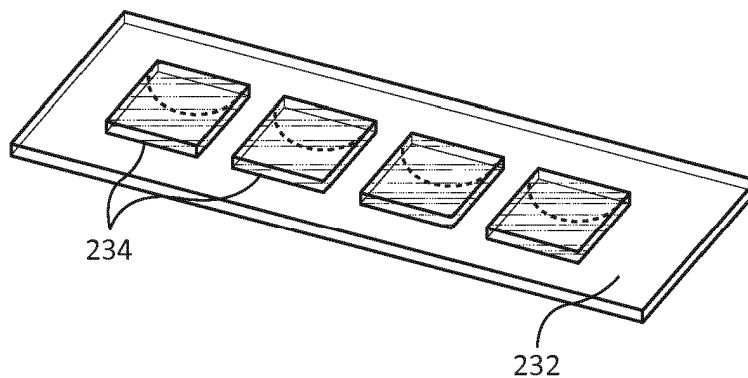


FIG. 2G

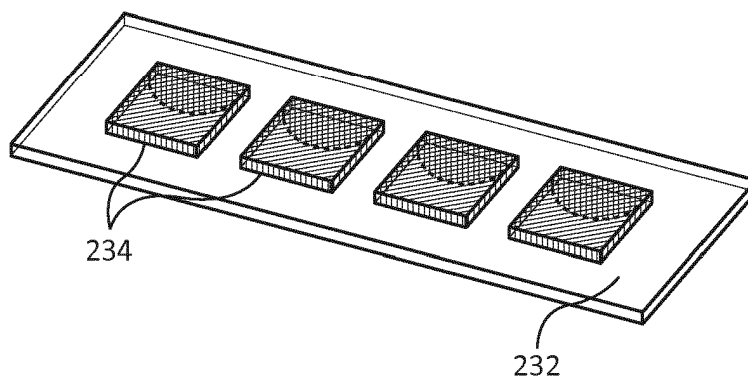


FIG. 2H

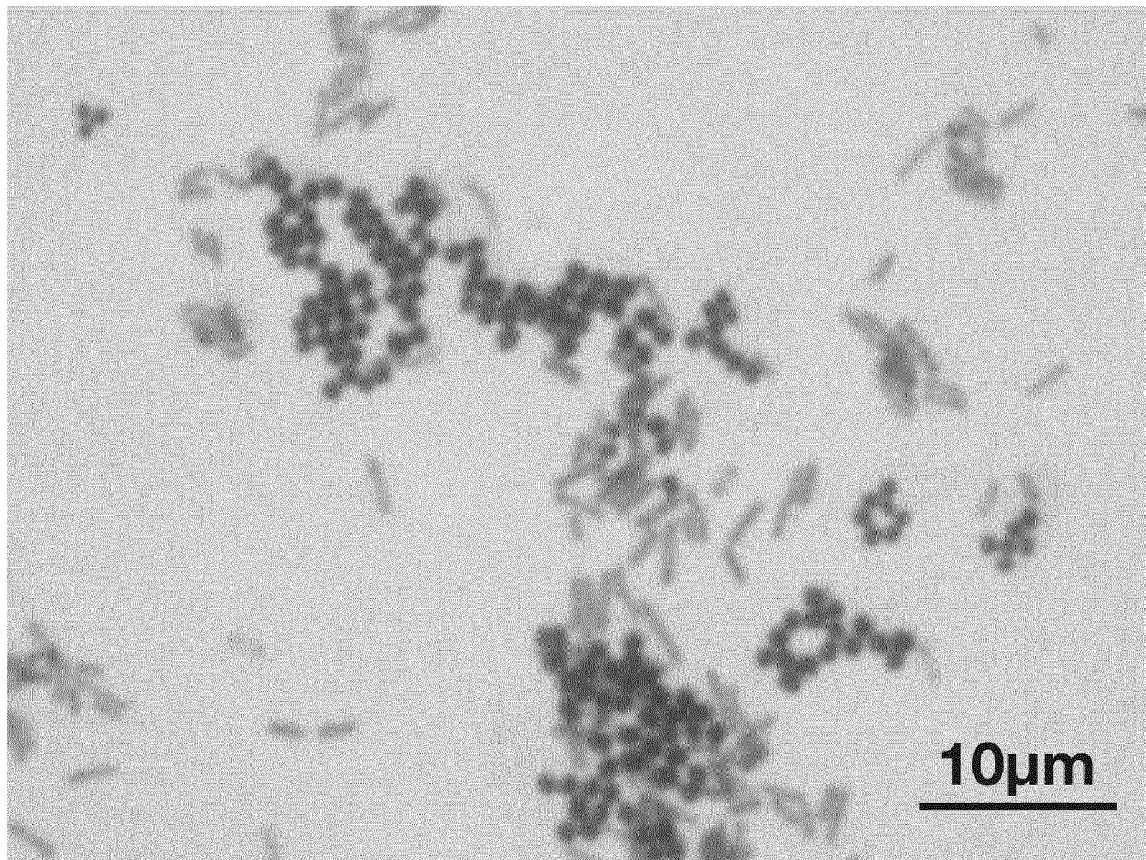


FIG. 2I

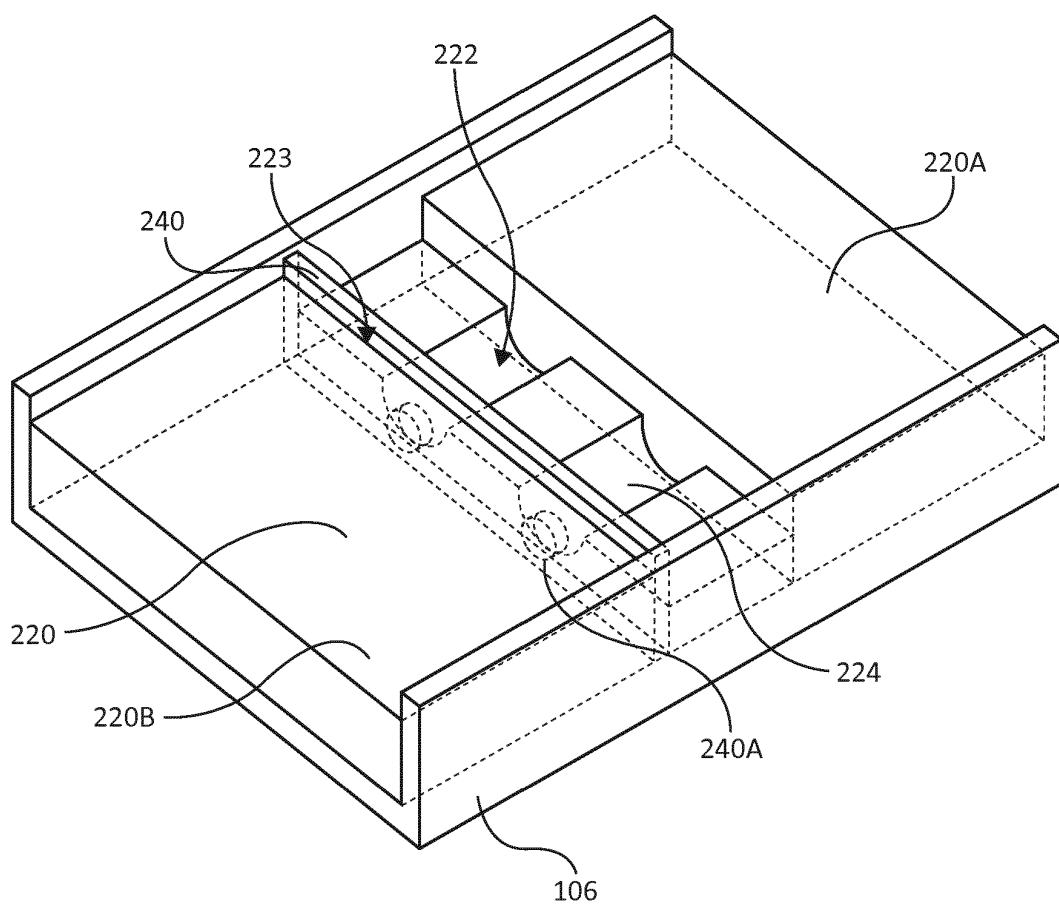


FIG. 2J

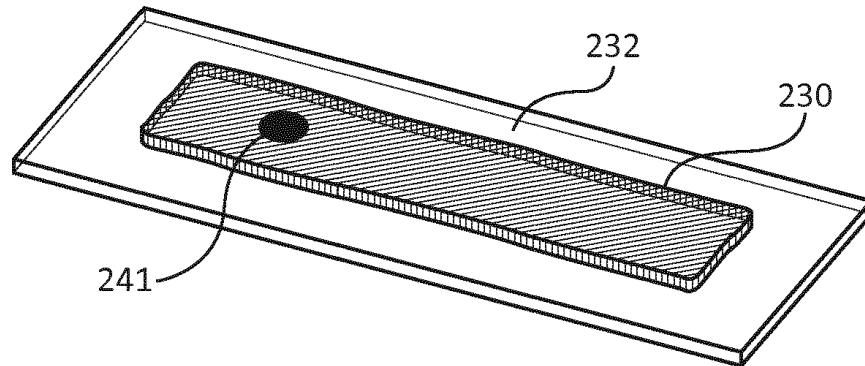


FIG. 2K

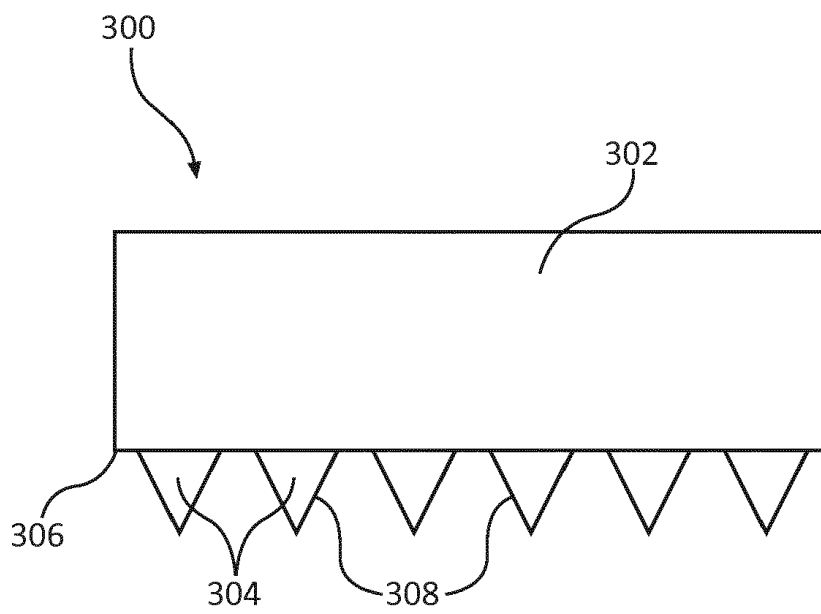


FIG. 3

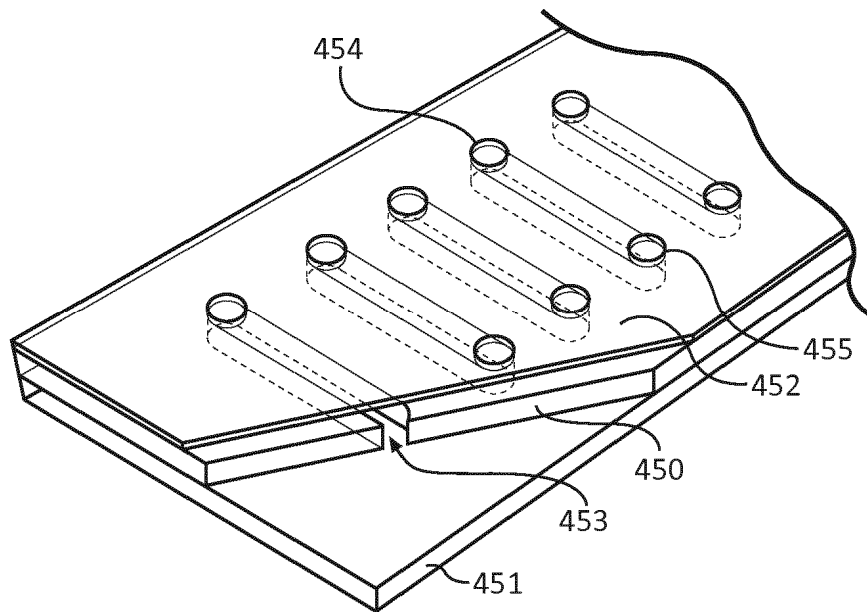


FIG. 4A

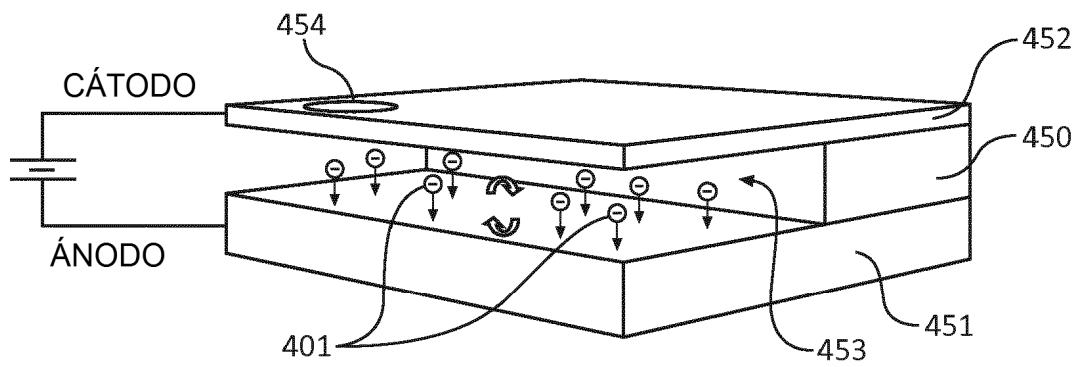
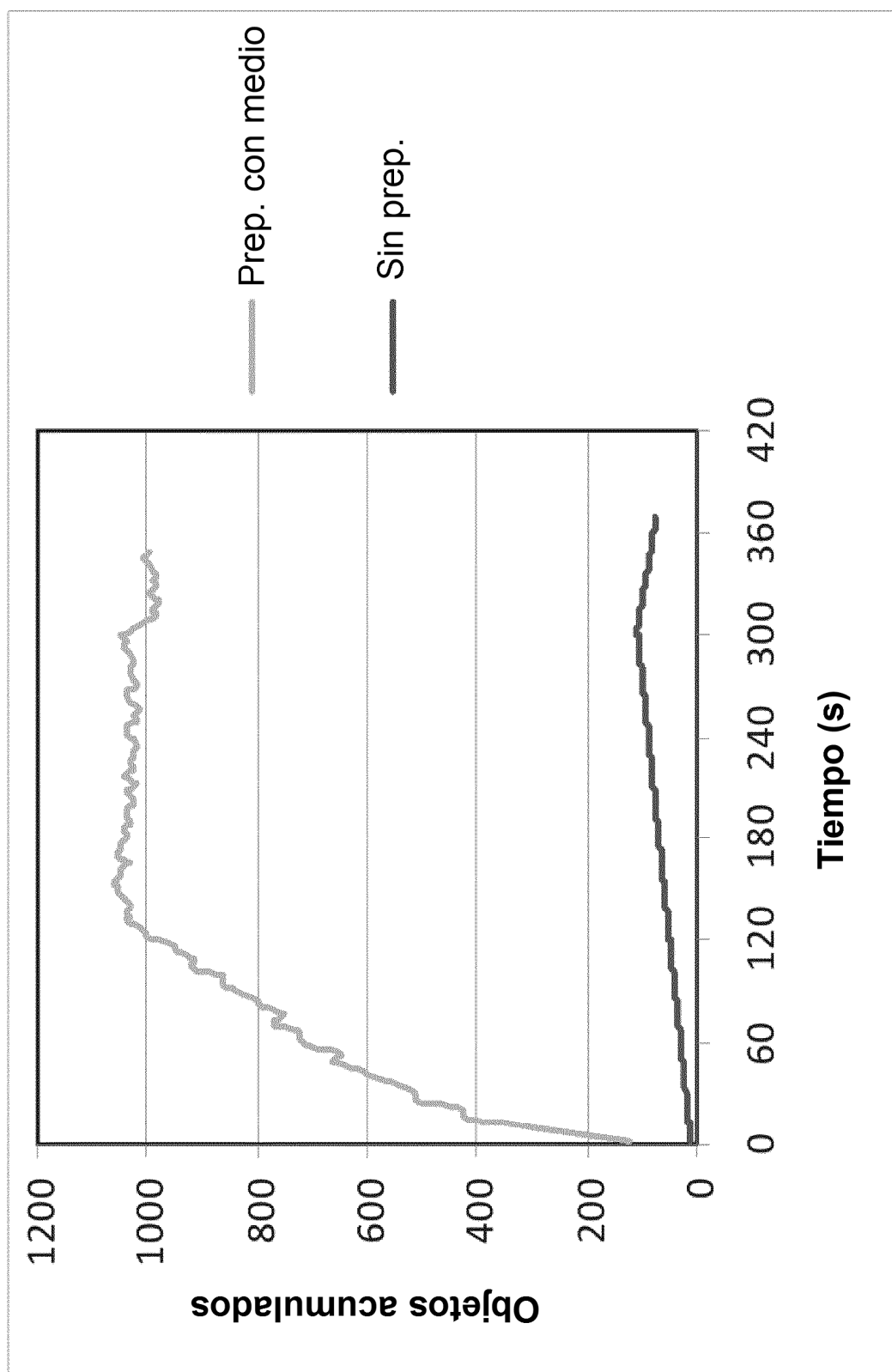


FIG. 4B

**FIG. 5**

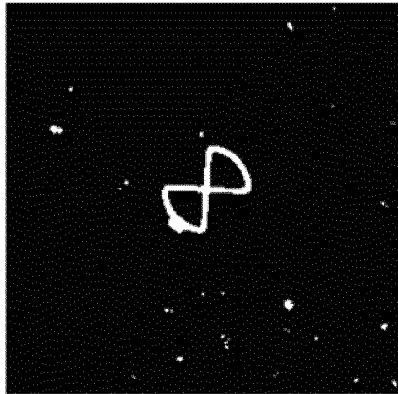


FIG. 6A

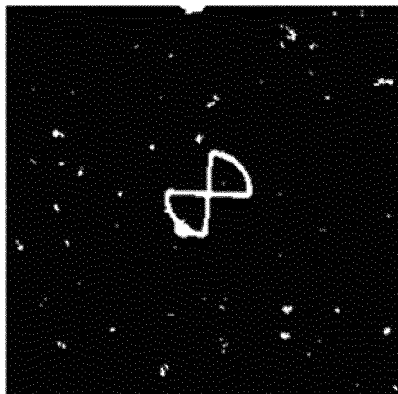


FIG. 6B

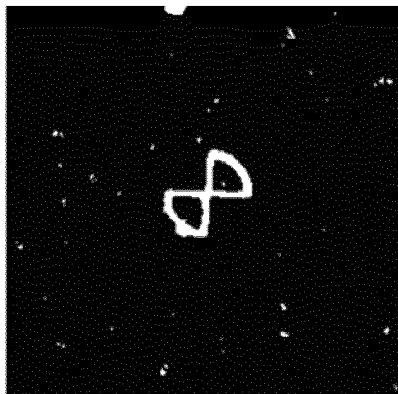


FIG. 6C

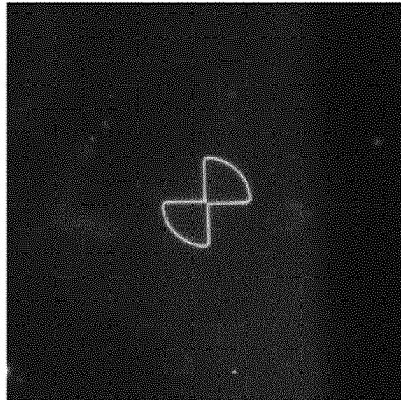


FIG. 7A

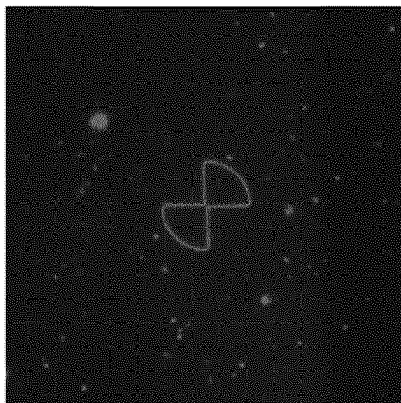


FIG. 7B

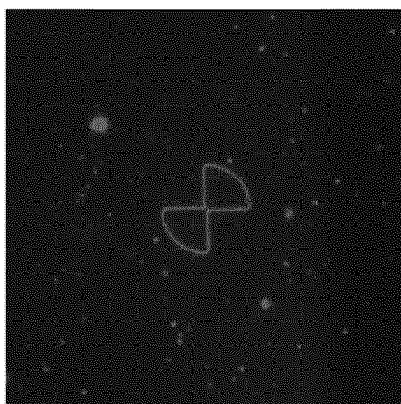


FIG. 7C

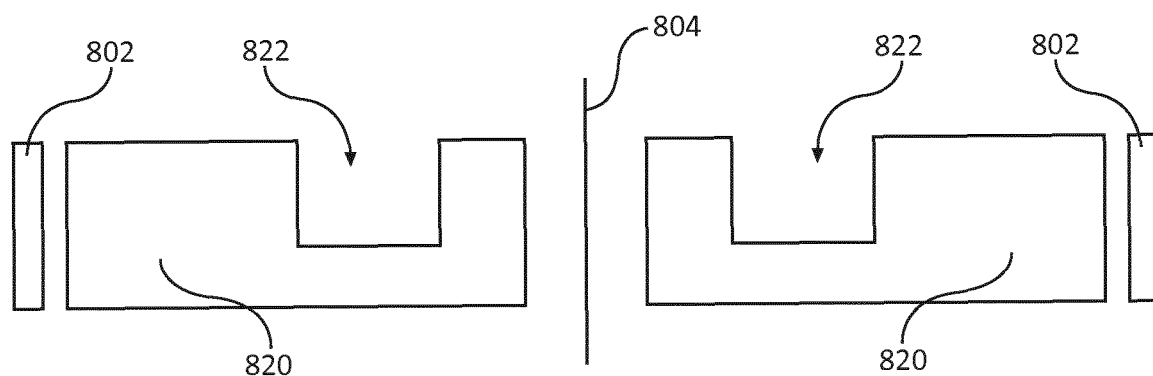


FIG. 8

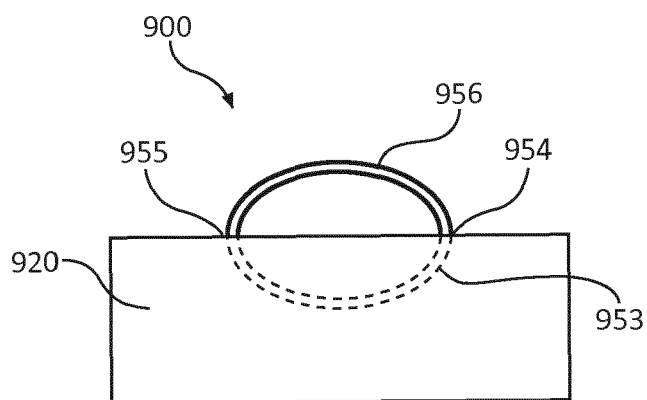


FIG. 9