

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 623**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09807424 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2326727**

54 Título: **Sistemas y métodos basados en citometría de flujo para la detección de microbios**

30 Prioridad:

15.08.2008 US 89387 P

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

17.10.2016

73 Titular/es:

**APERTURE BIO, LLC (100.0%)
9821 Katy Freeway, Suite 500
Houston, TX 77024, US**

72 Inventor/es:

**BUZATU, DAN, A.;
WILKES, JON, G.;
MOSKAL, TED, A.;
NEVIUS, BILL;
TAYLOR, JASON, T.;
TUCKER, RANDAL, K.;
MILLER, MELINDA y
RAMSANOOP, SHAWN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 586 623 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 y métodos basados en citometría de flujo para la detección de microbios

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Antecedentes

5 Los métodos actuales para detectar microbios en una muestra involucran usualmente etapas que consumen tiempo, tales como cultivo y/o amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la amplificación de ADN microbiano por la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la cual se utiliza en muchos métodos de ensayo, puede tomar hasta varias horas. De la misma manera, el cultivo de microbios en una muestra puede tomar varios días o incluso semanas. Los resultados obtenidos a partir de tales ensayos típicamente son no cuantitativos. Además, las técnicas de cultivo y amplificación de ácidos nucleicos son susceptibles de producir resultados de falsos positivos así como de falsos negativos.

15 Los retos antes mencionados en la detección de microbios se amplifican cuando muy pocos microbios objetivo de interés están presentes en una muestra particular. Por ejemplo, los métodos de detección convencionales carecen de la sensibilidad requerida para detectar del orden de 5-10 células microbianas en una muestra. La detección es adicionalmente problemática cuando hay microbios no objetivo copresentes con los microbios objetivo. Tales microbios no objetivo se denominan frecuentemente flora de fondo. Los retos asociados con el análisis de muestras también se hacen más difíciles cuando las muestras son derivadas de fuentes complejas, tales, por ejemplo, soluciones líquidas diluidas, muestras biológicas y fuentes de alimentos procesados (por ejemplo mantequilla de cacahuete).

20 La recolección de muestras microbianas a partir de diversas fuentes también presenta ciertos retos, puesto que muchas técnicas de recolección convencionales no proveen un ambiente suficientemente estéril para evitar la introducción de contaminación microbiana. Tales métodos de recolección estándar pueden ser especialmente imprácticos para recolectar y conservar muestras con muy pocos microbios objetivo de interés.

25 En años recientes, la citometría de flujo ha sido utilizada para detectar microbios a partir de diversas muestras. Sin embargo, tales métodos tienen también limitaciones puesto que muchas muestras tienen fluorescencia natural así como partículas de fondo que pueden reducir la certeza de que las señales detectadas representan los microbios de interés. Adicionalmente, la calibración, estandarización y operación general de los citómetros de flujo para producir resultados consistentes puede generar retos, especialmente para usuarios con experiencia limitada en la citometría de flujo.

30 A la vista de lo anterior, hay una necesidad actual por métodos, sistemas y kits para ser utilizados en la detección de microbios objetivo en una muestra utilizando protocolos rápidos, cuantitativos, específicos, consistentes y no complicados. Hay una necesidad adicional de que tales métodos, sistemas y kits sean apropiados para muestras que contiene pocos microbios objetivo de interés y para matices de muestra complicadas. Diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan métodos y sistemas por citometría de flujo para dirigirse a una o más de estas necesidades no satisfechas.

35 La FR2847589 divulga un método para detectar microorganismos (A) en un fluido biológico (B) tratando una muestra con un medio de reacción (C) que contiene un agente marcador (I) y al menos un agente de penetración celular (II) para membranas de (A); filtrar para retener cualquier (A) marcado de detectar cualquier (A) retenido, marcado.

40 La US2006134729 divulga un proceso para detectar microorganismos presentes en un fluido biológico que incluye a) poner en contacto una muestra de fluido biológico con un ambiente de reacción que comprende un agente marcador que es un derivado de cianinas y al menos un reactivo de penetración celular de la membrana de los microorganismos, b) filtrar la muestra sobre un filtro capaz de retener los microorganismos marcados presentes en la muestra, y c) detectar los microorganismos marcados retenidos en el filtro en la etapa (b).

45 Nobuyasu Yamaguchi et al, "Rapid detection of respiring *Escherichia coli* 0157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry", *Cytometry*, Vol. 54A, No. 1, páginas 27-35 divulga un método en el cual se utilizó CTC (cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio) para estimar la actividad respiratoria de bacterias. El anticuerpo directo anti-*E. coli* 0157:H7 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (FA) fue utilizado para la detección específica de células objetivo. Muestras de alimento fueron inoculadas con las células de *E. coli* 0157:H7 y *E. coli* K-12 en ayuno, y analizadas por microscopia de fluorescencia y por citometría de flujo después de tinción doble con FA y CTC.

50 La EP1918385 divulga un método para detectar células vivas, células lesionadas, células VNC, células muertas de un microorganismo en una muestra de prueba por citometría de flujo. El método involucra: a) la etapa de tratar la muestra de prueba con una enzima que tiene una actividad de descomposición de células diferentes a las del

5 microorganismo, partículas coloidales de proteínas o lípidos que existen en la muestra de prueba, b) la etapa de tratar la muestra de prueba con un veneno de topoisomerasa y/o un veneno del ADN griaasa, c) la etapa de tratar la muestra de prueba tratada en las etapas a) y b) con un agente de tinción nuclear, y d) la etapa de detectar el microorganismo en la muestra de prueba tratada con el agente de tinción nuclear por citometría de flujo. La WO2006031544 divulga un método para diagnosticar un microorganismo parásito que reside en glóbulos rojos, tal como *Babesia microti*.

Resumen

10 En diversas realizaciones, los métodos por citometría de flujo para detectar microbios objetivo en una muestra se divulgan aquí. Los métodos incluyen a) tratar la muestra con al menos un oxidante y al menos un detergente; b) desactivar el al menos un oxidante después de tratar la muestra; c) mezclar la muestra con al menos una sonda para formar una muestra marcada; d) introducir la muestra marcada en un citómetro de flujo; y e) analizar la muestra marcada. La al menos una sonda incluye al menos una etiqueta. La al menos un sonda se une a los microbios objetivo. La etapa de análisis incluye excitar la al menos una etiqueta con al menos una fuente de luz en el citómetro de flujo y detectar al menos una longitud de onda de emisión fluorescente.

15 Lo anterior a delinado de manera más bien amplia las características de la presente divulgación con el fin de que la descripción detallada que sigue pueda ser mejor entendida. En adelante se describirán características y ventajas adicionales de la divulgación, que forman parte de la materia de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 Para un entendimiento más completo de la presente divulgación y ventajas de la misma, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones que deben tomarse en conjunto con los dibujos acompañantes que describen una realización específica de la divulgación, en donde:

Las figuras 1A y 1B presentan esquemas ilustrativos de kits de frotis que pueden ser utilizados para recolectar muestras bacterianas objetivo;

La figura 8 representa un esquema que muestra una realización ilustrativa de la filtración electrónica;

25 La figura 10 presente gráficas de emisión del citómetro de flujo ilustrativas que muestran como el ruido en una región de detección puede no estar presente en otra región de detección;

Las figuras 11A-11C presentan gráficas de emisión por citómetro de flujo con salida ilustrativas obtenidas por los métodos RAPID-B para matrices de ensalada empacada, masa para galletas y de salami;

30 La figura 12A y 12B presentan gráficas de remisión por citómetro de flujo con salida ilustrativa obtenida por los métodos RAPID-B para matrices de pimientos jalapeños a diversos niveles de dilución;

La figura 13 presenta una gráfica de emisión por citometría de flujo con salida ilustrativa obtenida por métodos RAPID-B para una matriz de pimiento jalapeño de control negativo;

35 Las figuras 14A y 14B presentan gráficas de emisión con citómetros de flujo con salida ilustrativas obtenidas por los métodos RAPID-B que muestran que los reactivos de sonda y el esputo solo no producen fluorescencia de fondo en la región de detección Mtb de salida; y

Las figuras 15A-15C presentan gráficas de emisión por citómetro de flujo ilustrativas para recuentos bacterianos de Mtb obtenidos por los métodos RAPID-13 a partir de muestras de esputo de pacientes con tuberculosis.

Descripción detallada

40 En la descripción siguiente, se fijan ciertos detalles como cantidades, tamaños, etc., específicos de tal manera que proveen un entendimiento exhaustivo de las presentes realizaciones divulgadas aquí. Sin embargo. Será evidente para las personas de experiencia normal en el arte que la presente divulgación puede ser practicada sin tales detalles específicos. En muchos casos, los detalles concernientes a tales consideraciones y similares han sido omitidos puesto que tales detalles no son necesarios para obtener un entendimiento completo de la presente divulgación y caen dentro de las habilidades de personas de habilidad ordinaria en el arte relevante.

45 Con referencia a los dibujos en general, se entenderá que las ilustraciones tienen el propósito de describir realizaciones particulares de la divulgación y no pretenden ser limitantes para la misma.

5 Las definiciones y explicaciones que siguen pretenden y están previstas para controlar cualquier construcción futura a menos que se modifique claramente y de manera no ambigua en la Descripción Detallada siguiente o cuando la aplicación del significado haga cualquier construcción no significativa o esencialmente no significativa. En casos donde la construcción del término lo haga no significativo o esencialmente no significativo, la definición debería ser tomada del Webster Dictionary, 3rd Edition. Las definiciones y/o interpretaciones no deberían ser incorporadas a partir de otras solicitudes de patente, patentes o publicaciones relacionadas o no, a menos que se establezca específicamente en esta especificación, o si la incorporación es necesaria para mantener la validez.

10 A parte de los ejemplos operativos, o en donde se indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de componentes utilizados aquí deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

Tal como se utiliza aquí, el término "ejemplo" y el término "realización" tendrán significados equivalentes.

Tal como se utiliza aquí, el término "microbios" se refiere en general, por ejemplo, a microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos, virus, parásitos (por ejemplo, malaria), como entidades biológicas y combinaciones de los mismos. Los términos microbios y microorganismos se utilizarán aquí de manera intercambiable.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "muestra" se refiere en general, por ejemplo, a una composición que contiene microbios. Las muestras pueden ser obtenidas de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, humanos, animales, especímenes biológicos, suelos, fluidos, alimentos, objetos mecánicos, el ambiente, aire y objetos relacionados.

20 Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere en general, por ejemplo, a una entidad que tiene afinidad para unirse a microbios. Las sondas pueden ser específicas para un microbio o clases de microbios en particular, o pueden ser no específicos en su unión. Las sondas pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos (monoclonales, policlonales y combinaciones de los mismos), sondas de ARN, sondas de ADN, colorantes para ADN (por ejemplo tiasol naranja, yoduro de propidio, LDS-751), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), aptámeros, moléculas pequeñas, moléculas biomiméticas, fagos virulentos y objetos relacionados.

25 Tal como se utiliza aquí, el término "etiquetas" se refiere en general, por ejemplo, a una molécula, partícula, composición y/o unidad estructural que emite luz después de la excitación mediante una fuente de energía. Tales etiquetas pueden ser una parte inherente de una sonda (por ejemplo, colorantes para ADN) o pueden ser anexados a una sonda. Etiquetas ilustrativas utilizadas aquí pueden ser, por ejemplo, fluorocromos o fluoróforos.

30 Tal como se utiliza aquí, el término "clasificación de microorganismos", se refiere en general, por ejemplo, a la clasificación de microbios por uno más criterios diversos, tales como, por ejemplo, género, especie, cepa o combinación de los mismos. Los microbios que pertenecen a la "misma clasificación" de microorganismos se relacionan de manera sustancial por al menos uno de los diversos criterios.

Tal como se utiliza aquí, el término "microbios objetivo" se refiere en general, por ejemplo, los microbios que están siendo probados cuantitativa o cualitativamente en una muestra.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "componentes microbianos no objetivo" se refiere en general, por ejemplo, a los microbios en una muestra que no están siendo probados en una muestra. Sin limitación, los componentes de microbios no objetivo pueden incluir, por ejemplo, microorganismos indeseados, proteínas indeseadas, residuos celulares, objetos autofluorescentes y diversas combinaciones de los mismos.

40 Tal como se utiliza aquí, el término "FSC" se refiere en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría de flujo relacionado con luz dispersa de avance, que diverge típicamente de la dirección de la luz incidente por solamente unos pocos grados o menos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la luz dispersa de avance diverge de la dirección de la luz incidente por menos de aproximadamente 10 grados. En otras realizaciones, la luz dispersa de avance diverge de la dirección de la luz incidente por menos de aproximadamente 5 grados.

45 Tal como se utiliza aquí, el término "SSC" se refiere en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría de flujo que se relaciona con luz dispersa lateral, que diverge típicamente de la dirección de la fuente de luz incidente en una cantidad mayor de aproximadamente 10 grados. En algunas realizaciones, la luz dispersa lateral diverge de la dirección de la luz incidente en aproximadamente 60 grados hasta aproximadamente grados. En otras realizaciones, la luz dispersa lateral diverge de la dirección de la luz incidente en aproximadamente 20 grados hasta aproximadamente 60 grados.

50 Tal como se utiliza aquí, el término "FL-1", se refiere, en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría de flujo capaz de detectar luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 525 nm.

Tal como se utiliza aquí, el término "FL-2", se refiere, en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría

de flujo capaz de detectar luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 575 nm.

Tal como se utiliza aquí, el término "FL-3", se refiere, en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría de flujo capaz de detectar luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 610 nm.

5 Tal como se utiliza aquí, el término "FL-4", se refiere, en general, por ejemplo, a un canal de detección en citometría de flujo capaz de detectar luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 675 nm.

Definiciones adicionales además de las fijadas anteriormente también se incluyen aquí en la Descripción Detallada que sigue.

10 Principios de la citometría de flujo. La presente divulgación es pertinente en general a diversas realizaciones de sistemas, métodos y kits basados en citometría de flujo para detectar microbios objetivo en diversas muestras. La información básica sobre citometría de flujo puede encontrarse en numerosas referencias, tales como Shapiro's Practical Flow Cytometry, Third Edition (Alan R. Liss, Inc. 1995). Aunque los principios básicos de la citometría de flujo son conocidos para las personas de experiencia normal en el arte, los Solicitantes creen que las realizaciones presentadas en la presente divulgación son actualmente desconocidas en el arte.

15 La citometría de flujo puede ser utilizada para medir uno o más parámetros ópticos o eléctricos de células, microbios y/o otras partículas que pasan a través de un haz de luz, tal como, por ejemplo, un láser. En general, una muestra fluida que va a ser analizada es introducida en un tubo de muestra en o cerca al centro de una corriente que fluye más rápidamente de fluido envolvente, la cual transporta la muestra fluida a través del centro de las corrientes combinadas, comprimiendo hidráulicamente la muestra y haciendo que las células en el volumen de muestra formen una columna. Este proceso permite que las células, microbios y/o otras partículas sean entregados en el centro del punto de medición en una zona de examen (por ejemplo, una celda de flujo). Después de esto, un láser de onda continua enfoca un haz de láser sobre las células y/o partículas a medida que pasan a través de la zona de examen. Los detectores que están conectados ópticamente a la zona de examen obtienen la señal de esta zona o uno o más canales de detección (por ejemplo, FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4).

25 Cuando un objeto de interés en la corriente de flujo es golpeado por el haz de láser, se generan ciertas señales y son detectadas por los detectores. Los detectores utilizan una pluralidad de canales de detección o una detección de canal individual. Por ejemplo, estas señales incluyen intensidad de dispersión de avance, la cual provee información concerniente al tamaño de las células individuales, microbios y/o otras partículas. Otra señal común es la intensidad de dispersión lateral, que provee información concerniente a la granularidad (tamaño relativo, proporciones y propiedades de refracción) de células individuales, microbios y/o otras partículas. Otras señales pueden incluir emisiones de fluorescencia desde uno o más colorantes fluorescentes y/o moléculas fluorescentes asociados con las células, microbios u otras partículas. En algunas realizaciones, las células individuales, microbios y/o otras partículas son fluorescentes de manera inherente, mientras que en otras realizaciones, se hacen fluorescentes anexando al menos una etiqueta.

35 Cuando se emplean diferentes moléculas fluorescentes (esto es, etiquetas) en un esquema analítico de citometría de flujo, tal como para sondear diversos objetos de interés en una muestra, los picos de emisión de fluorescencia de las moléculas se seleccionan convencionalmente para minimizar o eliminar el solapamiento espectral entre los respectivos picos de emisión de fluorescencia. Por ejemplo, las moléculas fluorescentes pueden ser clasificadas en clases espectrales no solapables FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4 con base en sus picos de emisión de fluorescencia. En diversas realizaciones presentadas aquí, dos o más etiquetas pueden tener emisiones espectrales sustancialmente solapables. En diversas otras realizaciones presentadas aquí, dos o más etiquetas pueden tener emisiones espectrales sustancialmente no solapables.

45 La presente divulgación utiliza técnicas y sistemas de citometría de flujo para detectar microorganismos objetivo a través del uso de diversos métodos y kits. En diversas realizaciones, los métodos y kits pueden ser utilizados en combinación como parte de un protocolo de recolección de datos integrado. En otras diversas realizaciones, los métodos pueden ser llevados a cabo independientemente sin utilizar los kits para la recolección de muestras. Adicionalmente, otras diversas realizaciones de la presente divulgación son pertinentes a la calibración, estandarización y uso óptimo de los citómetros de flujo.

50 En algunas realizaciones, los kits, métodos de citometría de flujo, métodos de calibración y métodos de estandarización se utilizan todos juntos como parte de procesos integrados que analizan la presencia de microbios objetivo. En otras realizaciones, tales procesos integrados pueden no utilizar los kits antes mencionados. En todavía otras diversas realizaciones, cualquier método de citometría de flujo divulgado aquí puede ser puesto en práctica en combinación con cualquier otro método de citometría de flujo divulgado aquí. En algunas realizaciones, dos o más de los métodos de citometría de flujo divulgados aquí pueden ser combinados con otro. Adicionalmente, cualquier método de citometría de flujo divulgado aquí o combinaciones de cualquier método de citometría de flujo divulgado aquí pueden ser utilizados en combinación con cualquier método de calibración, estandarización o mejora de la

sensibilidad de la citometría de flujo divulgado aquí. Tales métodos, sistemas y kits serán descritos ahora en más detalle.

5 Recolectación y tratamiento de muestras. En la presente divulgación, las muestras pueden ser recolectadas a partir de diversas fuentes para el análisis por citometría de flujo. Tales fuentes pueden incluir sin limitación humanos, animales, plantas, semillas, alimentos, suelo, fluidos, objetos mecánicos, superficies, aire, el ambiente y objetos relacionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra que va a ser analizada puede ser una muestra biológica, tal como un tejido o fluido biológico. Sin limitación, el tejido o fluido biológico puede contener cualquier patógeno microbiano detectable. En algunas realizaciones, el patógeno microbiano puede ser tuberculosis. En algunas realizaciones, una muestra que va a ser analizada puede ser una fuente de agua tal como, por ejemplo, de un lago. En todavía otras realizaciones, una muestra que va a ser analizada puede ser obtenida de una fuente de alimento. Sin limitaciones, las fuentes de alimento pueden ser, por ejemplo, vegetales, carnes y alimentos procesados. Vegetales ilustrativos de los cuales pueden obtenerse muestras incluyen, por ejemplo, tomates, espinacas y pimientos jalapeños. Carnes ilustrativas incluyen, por ejemplo, res, cerdo, pollo y pescado. Alimentos procesados ilustrativos incluyen, por ejemplo, lotes de mantequilla de cacahuete, masa para galletas y salami. Los ejemplos ilustrativos de muestras incluidos más arriba no deberían considerarse como limitantes del alcance de la divulgación.

20 Las muestras pueden ser recolectadas por diversos métodos bien conocidos para los de experiencia normal en el arte. Sin limitación, pueden utilizarse utensilios tales como, por ejemplo, torundas y espátulas para recolectar una muestra. En diversas realizaciones, las muestras pueden ser recolectadas en contenedores, particularmente aquellas muestras que están en forma líquida o gaseosa. Las muestras pueden ser procesadas posteriormente para ser la muestra más adecuada para los métodos de citometría de flujo. Por ejemplo, las muestras pueden ser trituradas, cortadas, concentradas y/o filtradas antes del análisis por citometría de flujo.

25 Kits de torundas. En diversas realizaciones, un kit de torundas puede ser utilizado para recolectar microbios objetivo a partir de una muestra para análisis citométrico de flujo. En diversas realizaciones, tales kits de torundas pueden incluir una carcasa; una torunda en la carcasa para recolectar una muestra; una fuente líquida para suministrar un líquido hacia la carcasa para disociar al menos algunos de los microbios de la torunda; un filtro permeable a los microbios para separar los microbios disociados de otros objetos en la muestra; y una unidad de recolección para recolectar los microbios separados. En otras diversas realizaciones, la fuente líquida en el kit de torunda puede ser un contenedor que almacena y dispensa el líquido hacia la carcasa. De la misma manera, el líquido puede ser un regulador. En algunas realizaciones, el líquido puede incluir un oxidante y/o un surfactante. Además, tales kits de torunda pueden ser integrados o modulares. En la operación, tales kits de torunda pueden ayudar a recolectar, resuspender y filtrar las muestras.

35 Las figuras 1A y 1B presentan un esquema ilustrativo de los kits de torunda que pueden ser utilizados para recolectar muestras bacterianas objetivo. Con referencia a la figura 1A, el kit 10 de torunda se muestra en un primer ejemplo ilustrativo de un kit de torunda adecuado para uso en la presente divulgación. Tal como se muestra, el kit 10 de torunda incluye en general una carcasa 12, una torunda 14, un filtro 18, una unidad 20 de recolección y un contenedor 24. En este ejemplo, no limitante, la carcasa 12 es una estructura cilíndrica y transparente con un extremo distal y un extremo proximal. De la misma manera, la torunda 14 en este ejemplo es una estructura en forma de pluma con una barra 15 y una punta 16. La punta 16 puede adquirir microbios objetivo y liberarlos después de exposición a un líquido o líquidos. En algunas realizaciones, la punta 16 puede ser un filtro de baja impedancia, tal como por ejemplo, un filtro de polipropileno. En algunas realizaciones, la punta 16 comprende un material bajo en partículas, de tal manera que el material de la torunda no contamine la muestra.

45 Con referencia todavía a la figura 1A, el filtro 18 puede ser cualquier composición que pueda separar microbios de otros objetos. En algunas realizaciones, el filtro 18 puede ser una composición que es permeable a microbios pero impermeable a objetos y/o partículas más grandes. En diversas otras realizaciones, el filtro 18 puede estar compuesto de polipropileno, policarbonato y/o otros polímeros similares. El filtro 18 también puede tener diversos tamaños de poro. En algunas realizaciones, el tamaño de poro puede ser desde aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 10 μm . En otras realizaciones, el tamaño de poro puede ir desde aproximadamente 3 μm hasta aproximadamente 7 μm . En todavía otras realizaciones, el tamaño de poro puede ir desde aproximadamente 4.5 μm hasta aproximadamente 5.5 μm .

La unidad 20 de recolección puede ser utilizada para recolectar microbios después de la filtración por el filtro 18. Como se muestra en la figura 1A, la unidad 20 de recolección puede estar localizada en el extremo distal de la carcasa 12, y deseablemente por debajo del filtro 18. También como se muestra en la figura 1A, la unidad 20 de recolección puede incluir adicionalmente un puerto 22 de dispensación para la dispensación de una muestra.

55 El kit 10 de torunda puede incluir adicionalmente un contenedor 24. En el ejemplo mostrado en la figura 1A, el contenedor 24 puede incluir la parte 25 indentada con una barra 26 rompible. En algunas realizaciones, el contenedor 24 puede estar posicionado por encima del eje de la línea A en el extremo proximal de la carcasa 10. En realizaciones adicionales, el contenedor 24 puede contener un regulador. Por lo tanto, la ruptura de la barra 26

permite que el regulador fluya hacia la carcasa 12. Sin embargo, en otras realizaciones, pueden introducirse reguladores u otros líquidos en los kits de torunda a través de otros mecanismos. Por ejemplo, pueden introducirse reguladores en los kits de torunda directamente sin el uso de ningún contenedor o equipo especializado.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, los reguladores asociados con los kits de torunda ayudan en general a liberar los microbios de una muestra obtenida sobre una torunda, estabilizar los microbios obtenidos, y/o tratar la muestra por diversos métodos (por ejemplo, tratamiento con oxidantes, enzimas, detergentes y materiales similares). Los reguladores adecuados para uso con los kits de torunda pueden incluir por lo tanto diversos componentes adicionales tales como, por ejemplo detergentes (por ejemplo, Tween 20 o Tween 80), oxidantes (por ejemplo, H₂O₂), reguladores de fosfato (por ejemplo, PBS), enzimas y/o aditivos antimicrobianos (por ejemplo, azida de sodio). En ciertas realizaciones, un regulador puede incluir aproximadamente 0.1% en peso de azida de sodio, aproximadamente 250 µm de EDTA y aproximadamente 0.01% en peso de Tween 20 en 1X-PBS. En ejemplos adicionales, los reguladores pueden estar en forma concentrada para dilución subsecuente en las unidades de recolección.

Los kits torunda de la presente divulgación pueden ser utilizados en diversos métodos. Por ejemplo, en un ejemplo, la torunda 14 puede ser retirada de la carcasa 12 y presionada contra una muestra que va a ser analizada de tal manera que al menos una parte de la muestra se adhiera a la punta 16. Después de esto, la torunda 14 puede ser colocada de regreso en la carcasa 12. El contenedor 24 puede ser reposicionado en el extremo proximal de la carcasa 12. A continuación, la barra 26 puede ser presionada por un operador de tal manera que se rompa y libera cualquier regulador dentro del contenedor hacia la carcasa 12. El kit 12 de torunda puede ser sometido a vórtex entonces durante un período de tiempo zt suficiente para promover la liberación de al menos una parte de los microbios sobre la punta 16 hacia el regulador. Tales períodos de tiempo pueden variar dependiendo de la muestra. Por ejemplo, en un caso, la muestra puede ser sometida a vórtex durante aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 10 minutos. Subsecuentemente, el kit de torunda 10 puede ser posicionado verticalmente para permitir que el regulador fluya a través del filtro 18 y hacia la unidad 20 de recolección. La muestra puede ser recolectada entonces a través del puerto 22 de dispensación para análisis o tratamiento posterior.

Ventajosamente, el uso de kits de torunda en la presente divulgación puede permitir que los ensayos mantengan integridad y consistencia cuantitativa. Por ejemplo, los kits de torunda pueden excluir ventajosamente partículas suficientemente grandes que ocluyen el canal de la celda central u otros pasos de líquidos estrechos de un sistema de citometría de flujo. Adicionalmente, el uso de tales kits de torunda puede reducir la interferencia óptica durante la citometría de flujo debido a la eliminación de materiales de fondo ópticamente activos, tales como partículas de alimentos y materiales similares.

El kit de torunda ilustrativo representado en la figura 1A es apenas un ejemplo de los kits de torunda utilizados para poner en práctica la presente divulgación. Otras diversas realizaciones de kits de torunda pueden ser igualmente útiles, y la realización representada en la figura 1A no debe considerarse como limitante. Por ejemplo, la figura 1B ilustra un kit 30 de torunda como otro kit de torunda adecuado para uso en las realizaciones de la presente divulgación. El kit 30 de torunda se muestra con carcasa 32, torunda 34, filtro 38, unidad 40 de recolección y contenedor 44. La torunda 34 incluye adicionalmente una barra 35 y una punta 36. El contenedor 44 en este ejemplo puede incluir adicionalmente una unidad 46 de inmovilización y torunda 34 de soporte. De la misma manera, la unidad 40 de recolección puede incluir la tapa 52 con el código de barras 50, el cual puede ser utilizado para una identificación fácil de una muestra y/o ensayo en particular.

El kit 30 de torunda también puede ser usado en diversos métodos divulgados aquí. Por ejemplo, en un ejemplo, la torunda 34 puede ser retirada de la carcasa 32 y presionada contra una muestra que va a ser analizada como se describió previamente. Después de esto, la torunda 34 puede ser colocada de nuevo en la carcasa 32. Puede agregarse entonces un regulador adecuado a la carcasa 32. Después de reposicionar el contenedor 44 en el extremo proximal de la carcasa 32, el kit de torunda puede ser invertido de tal manera que el regulador que contiene la muestra pase a través del filtro 38. En otras realizaciones, el puerto 48 de dispensación sobre el contenedor 44 puede ser posicionado en la parte superior de la unidad 40 de recolección después de retirar la tapa 52.

Los solicitantes también prevén el uso de kits de torunda en otras realizaciones de la presente divulgación que no incorporan todos los componentes antes mencionados. Por ejemplo, en una realización, un kit de torunda puede incluir solamente una carcasa y un filtro que es permeable a microbios.

Los solicitantes anotan adicionalmente que el uso de los kits de torunda es solamente una de las muchas maneras de recolectar y tratar una muestra. Independientemente del uso de los kits de torunda, las muestras obtenidas pueden ser tratadas por métodos diversos. Como se mencionó previamente, tales tratamiento pueden incluir sin limitación: tratamiento con detergentes; tratamiento con oxidantes; y tratamiento con enzimas. Además, las muestras pueden ser concentradas por diversos métodos. El contenido de proteína de diversas muestras puede también ser reducido. En lo que sigue se definen detalles adicionales concernientes a estas realizaciones de la presente divulgación.

Concentración de la muestra. En otras realizaciones de la presente divulgación, las muestras pueden ser concentradas por diversos métodos. Tales etapas de concentración pueden ser particularmente beneficiosas cuando se desea detectar y/o cuantificar microbios objetivo en un gran volumen de una muestra líquida (por ejemplo, muestras de 100 ml a 4 L). Pueden utilizarse diversos métodos para concentrar tales muestras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los microbios pueden ser recuperados a partir de un líquido para análisis por citometría de flujo mediante (1) filtración de líquidos sobre un filtro que captura los microbios objetivo; (2) colocación del filtro en un tubo u otro contenedor; (3) lavado del filtro con el fin de liberar los microbios; (4) centrifugar el tubo u otro contenedor para transportar los microbios liberados hacia la parte inferior del tubo; y (5) resuspensión de los microbios objetivo. En diversas realizaciones, los líquidos usados pueden ser agua. En diversas realizaciones, la centrifugación puede tener lugar durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6.000 rpm.

En algunos casos, la muestra puede producir una suspensión que es tan pesada y espesa que la filtración inicial es impráctica. Por lo tanto, en otras realizaciones diversas, la separación de los microbios objetivo de las partículas no objetivo, puede proceder sin la etapa de filtración descrita más arriba mediante (1) centrifugación durante una duración corta para precipitar partículas grandes; (2) decantación del líquido sobrenadante que contiene microbios objetivo aun no precipitados; (3) filtración del líquido sobrenadante como se indicó más arriba o ejecución de una técnica de separación alternativa tal como, por ejemplo, fraccionamiento por flujo de campo, (4) resuspensión de los microbios objetivo.

En otras realizaciones, una solución líquida puede ser filtrada a través de un filtro de policarbonato de 0.22 μm durante un período de tiempo suficiente para retener las bacterias presentes inicialmente en el líquido (por ejemplo, 2.5 minutos). El filtro puede ser retirado entonces y colocado en un tubo de centrifuga de 15 ml, por ejemplo. A continuación el filtro puede ser lavado con 10 ml de agua, por ejemplo (por ejemplo, utilizando una jeringa con una aguja). El lavado puede ser logrado, por ejemplo, haciendo retroflujo del filtro. Después de esto, el tubo puede ser centrifugado durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6.000 rpm para proveer una pella sólida que contiene las bacterias. La mayor parte del líquido sobrenadante es retirado (por ejemplo, aproximadamente 9.2 ml de la parte superior), y los restantes 800 μl de la solución pueden ser sometidos a vórtex para resuspender la pella así obtenida. La muestra resuspendida puede ser analizada entonces por los métodos de citometría de flujo.

Se pueden prever otras realizaciones de concentración de muestra. Por ejemplo, el tiempo de centrifugación de una muestra puede ser acortado o alargado, dependiendo de las ratas de recuperación deseadas. El volumen del líquido que va a ser filtrado también puede incrementarse hasta aproximadamente 1 L con el fin de proveer una sensibilidad cualitativa mayor o resultados cuantitativos más exactos recolectando más microbios. Además, el tiempo de filtración puede variarse.

Recuperación de microbios a partir de muestras que tienen altos contenidos de proteínas. Muchas muestras que potencialmente contienen microbios objetivo también pueden contener altas concentraciones de proteínas que pueden interferir potencialmente con la interpretación y/o análisis de los resultados de citometría de flujo. Por ejemplo, las proteínas en tales muestras pueden enlazarse de manera no específica a diversas sondas usadas para detectar microbios objetivo y llevar a la generación de resultados positivos falsos. Ejemplos no limitantes de tales muestras con contenido alto de proteínas pueden incluir, por ejemplo, leche, mantequilla de cacahuete, lisados celulares, orina, sangre y materiales relacionados. Por lo tanto, en otras diversas realizaciones de la presente divulgación, se presentan métodos para recuperar microbios de muestras con altos contenidos de proteína con el fin de facilitar los análisis por citometría de flujo de los microbios en estas muestras.

En diversas realizaciones, los métodos para recuperar microbios de muestras con alto contenido de proteína incluyen: (1) hacer disminuir el pH de la muestra para hacer que al menos algunas de las proteínas en la muestra se aglomeren; (2) filtrar la muestra aglomerada sobre un filtro que es permeable a los microbios de interés; (3) refiltrar la muestra sobre un filtro que capture los microbios; (4) sumergir el filtro en un líquido; y (5) someter opcionalmente a vórtex el filtro para disociar los microbios hacia el líquido. En diversas otras realizaciones, las etapas de inmersión y vórtex opcional pueden tener lugar en un tubo (por ejemplo, en un tubo de centrifugas) u otro contenedor adecuado. En realizaciones adicionales, el líquido puede ser un regulador, tal como 1X PBS.

El pH de una muestra puede hacerse disminuir hasta un punto adecuado para que ocurra la aglomeración agregando una solución ácida, tal como, por ejemplo, ácido acético al 10%, a la muestra. Otros diversos ácidos adecuados para inducir la aglomeración pueden ser previstos por las personas de experiencia normal en el arte. Además, los rangos de pH de aglomeración adecuados pueden variar para diferentes muestras. Por ejemplo, una muestra de leche puede aglomerarse en el rango de pH de aproximadamente 4.7 a 4.2. El período de tiempo para que ocurra la aglomeración puede variar también para diferentes muestras. Por ejemplo, tales períodos de tiempo pueden variar desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos para muestras con alto contenido de proteína tales como la leche.

Después de que ha ocurrido una aglomeración sustancial, la muestra puede ser filtrada sobre uno o más filtros que sean permeables a un microbio objetivo de interés pero que retenga sustancialmente las proteínas aglomeradas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, tal filtro adecuado puede ser un filtro de policarbonato con tamaños de poro que

varían desde 5 μm hasta 8 μm . En otras realizaciones, pueden usarse filtros múltiples sucesivamente con la disminución de tamaños de poro. En realizaciones adicionales, puede utilizarse una fuente de vacío para facilitar la filtración.

El filtrado puede ser entonces refiltrado a través de uno o más filtros que puedan capturar sustancialmente los microbios objetivo deseados en la muestra. En diversas realizaciones, tales filtros pueden ser filtros de policarbonato con tamaños de poro que varían desde aproximadamente 0.2 μm hasta aproximadamente 0.45 μm . Después de esto, los microbios capturados pueden ser liberados desde los filtros para análisis, tal como se indicó aquí más anteriormente. Por ejemplo, en una realización, uno o más filtros que contienen los microbios objetivo capturados de interés pueden ser colocados en un tubo con un regulador adecuado (por ejemplo, 1X-PBS) y sometidos a vórtex durante un período de tiempo suficiente para permitir que los microbios objetivo capturados se desorban hacia la suspensión. Los microbios objetivo desorbidos pueden ser aislados entonces por centrifugación, por ejemplo. En algunas realizaciones, el volumen del regulador puede ser desde aproximadamente 800 μl hasta aproximadamente 10 ml. En otras realizaciones, el vórtex puede hacerse durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 10 minutos.

Tratamiento con detergentes. Las muestras analizadas por los métodos de citometría de flujo en cualquiera de las diversas realizaciones de la presente divulgación pueden ser tratadas con detergentes o surfactantes individuales o múltiples con el fin de eliminar o sustancialmente reducir la presencia de diversas partículas que pueden interferir con el análisis por citometría de flujo. Por ejemplo, tales partículas pueden ser gotitas de aceite fluorescente que pueden estar presentes en alimentos grasos, tales como pollo, helado, mantequilla de cacahuete y similares. Si no se eliminan, tales partículas pueden ser tomadas erróneamente por bacterias u otros microbios durante la citometría de flujo. En otras realizaciones, los detergentes pueden ser utilizados para suspender y/o estabilizar las muestras.

Los detergentes adecuados para uso en la presente divulgación pueden incluir sin limitación y en diversas combinaciones, polietilén glicol, EDTA, Triton 100, Tween 80, dodecil sulfato de sodio (SDS), y similares. Además, los detergentes pueden estar presentes en un regulador y/o otra solución a diversos rangos de concentración. En algunas realizaciones, tales rangos de concentración pueden variar desde aproximadamente 0.01% en peso hasta aproximadamente 5% en peso de la solución. En otras realizaciones, tales rangos de concentración pueden variar desde aproximadamente 0.1% en peso hasta aproximadamente 5% en peso de la solución. En todavía otras realizaciones, tales rangos de concentración pueden variar desde aproximadamente 3% en peso hasta aproximadamente 5% en peso de la solución. En diversas realizaciones, una solución puede incluir desde aproximadamente 0.1% en peso hasta aproximadamente 5% en peso de Tween 80. Tales detergentes pueden ser expuestos a una muestra como parte de un regulador del kit de torunda como se describió previamente aquí más arriba (por ejemplo, como parte de una punta de torunda o un regulador en el kit de torunda). Las muestras también pueden ser expuestas a detergentes por otros diversos mecanismos conocidos para personas de experiencia normal en el arte.

En diversas realizaciones, las muestras en la presente divulgación pueden ser tratadas con uno o más detergentes por diversos períodos de tiempo que son suficientes para eliminar o sustancialmente reducir la presencia de partículas de fondo y otras interferencias. Por ejemplo, las muestras pueden ser mezcladas con un detergente durante un período de tiempo que varía desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 120 minutos. En otras realizaciones, los períodos de mezcla pueden variar desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 minutos. En todavía otras realizaciones, los períodos de mezcla pueden variar desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 20 minutos.

Uso de altas concentraciones de detergente. En diversas realizaciones de la presente divulgación, las concentraciones de detergente pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5% en peso. Se ha encontrado que tales concentraciones de detergente relativamente altas optimizan los resultados de la citometría de flujo. Sin estar limitados por ninguna teoría o mecanismo, se prevé que el uso de concentraciones altas de detergente (por ejemplo, desde aproximadamente 3% en peso hasta aproximadamente 5% en peso de una solución de muestra), puede potenciar ventajosamente el enlazamiento de sondas particulares a sus respectivos epítomos sobre un microbio objetivo de interés. De acuerdo con la comprensión mecánica actual se cree que tales concentraciones altas de detergentes pueden hacer que tales epítomos sean más accesibles a las sondas utilizadas en los métodos de citometría de flujo descritos aquí. Por ejemplo, el uso de Tween 80 a aproximadamente 5% en peso de una solución de muestra regulada provee beneficios ventajosos en la estabilización del enlazamiento de anticuerpos a epítomos específicos sobre una superficie bacteriana en diversas realizaciones de los ensayos de citometría de flujo presentados aquí. Otra ventaja de utilizar concentraciones altas de detergente es que la disociación de agregados de macropartículas de microbios objetivo agrupados puede ser mejorada. Por ejemplo, los agregados de macropartículas de los microbios objetivo pueden formarse cuando la superficie de la célula es cerosa. Tales agregados de macropartículas pueden no registrarse en un ensayo de citometría de flujo con el tamaño, forma o granularidad esperada de los microbios objetivo.

Puesto que altas concentraciones de detergentes pueden también afectar directamente la viabilidad de los microbios después de exposición prolongada, es deseable que la muestra que va a ser tratada con altas

5 concentraciones de detergentes sea expuesta a tales altas concentraciones solamente durante períodos de tiempo cortos tales como, por ejemplo, desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 30 minutos en algunas realizaciones, o desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos y en otras realizaciones. En algunas realizaciones de los métodos de la presente divulgación, una muestra puede ser tratada inicialmente con una baja concentración (por ejemplo, menos de aproximadamente 3% en peso) de un detergente para un período suficiente de tiempo para proveer la eliminación de partículas interferentes. Después de esto, la concentración de detergente puede incrementarse y la muestra puede mezclarse adicionalmente durante un período corto de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos) antes del análisis.

10 Tratamiento con oxidantes. Las muestras en la presente divulgación también pueden ser tratadas con uno o más oxidantes antes de ser analizadas por citometría de flujo. Sin estar limitados por ninguna teoría, se cree que el uso de uno o más oxidantes provee condiciones de citometría de flujo más óptimas para el análisis cuantitativo de microbios objetivo oxidando fluoróforos interferentes potenciales en una muestra. Tales fluoróforos interferentes pueden estar presentes en diversas muestras complejas, tales como, por ejemplo, alimentos (por ejemplo, plantas y vegetales) y especímenes biológicos (por ejemplo, esputo y sangre).

15 Especies oxidantes adecuadas para uso en los métodos de la presente divulgación pueden incluir sin limitación, hipoclorito, clorito, clorato, perclorato, perácidos, peróxidos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), metil etil cetona peróxido, triacetona triperóxido, hexametilén triperóxido diamina, dietil éter peróxido, permanganato, sulfóxidos, tetróxidos de osmio, peryodato, óxido nitroso, ozono, OXONE (peroxomonosulfato de potasio) y oxidantes similares. Una persona de experiencia normal en el arte reconocerá que cuando la especie oxidante es un anión o catión, pueden combinarse diversos contraiones con la especie oxidante para formar diversas sales. Cualquiera de las diversas sales de las diversas especies oxidantes puede ser utilizada de manera equivalente dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación.

20 Tales especies oxidantes pueden ser utilizadas a lo largo de diversos rangos de concentración. Ejemplos no limitantes de tales rangos de concentración pueden incluir, por ejemplo, desde aproximadamente 0.1% en peso hasta aproximadamente 2% en peso con respecto a la cantidad de muestra, o desde aproximadamente 1% en peso hasta aproximadamente 2% en peso con respecto a la cantidad de muestra.

25 Los oxidantes de la presente divulgación pueden ser incluidos en diversas composiciones, tales como en reguladores u otras soluciones. En algunas realizaciones, los oxidantes pueden estar presentes como parte de un kit de torunda como se describió previamente aquí más arriba. Por ejemplo, uno o más oxidantes pueden estar presentes en un regulador que puede ser utilizado en un kit de torunda. En otra realización, uno o más oxidantes (tales como, H_2O_2) pueden estar presentes como parte de la torunda en el kit de torunda. Tales kits de torunda que contienen uno o más oxidantes pueden incluir adicionalmente uno o más surfactantes.

30 Las muestras de la presente divulgación pueden ser tratadas con oxidantes durante diversos períodos de tiempo. En algunas realizaciones, tales períodos de tiempo pueden variar desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 60 minutos. En otras realizaciones, tales períodos de tiempo pueden variar desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 30 minutos.

35 De relevancia particular para los métodos de análisis por citometría de flujo, un problema que puede surgir con el uso de oxidantes en el procesamiento de una muestra es que los oxidantes en sí mismo puedan ser óptica o químicamente activos. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno es un ejemplo notable. Adicionalmente, tales oxidantes también pueden oxidar y degradar las etiquetas fluorescentes sobre las sondas utilizadas comúnmente en los análisis por citometría de flujo una vez que son agregados a la muestra. Sin embargo, los métodos de la presente divulgación proveen métodos para desactivar los oxidantes antes de la adición de las sondas de citometría de flujo a las muestras. En otras palabras, los oxidantes son detenidos antes de mezclar las muestras con las sondas. La desactivación oxidante puede ser lograda por diversos mecanismos tales como, por ejemplo, disposición de la muestra a luz ultravioleta, incubación de la muestra a temperatura ambiente durante un período de tiempo suficiente para permitir que el oxidante se degrade naturalmente, y/o mediante reducción química. Otros diversos métodos para desactivar oxidantes pueden ser específicos para un oxidante dado y serán evidentes para las personas de experiencia normal en el arte. Los métodos para desactivación de oxidantes presentados aquí no deberían ser considerados como limitantes del espíritu y alcance de la divulgación.

40 La exposición de una muestra tratada con oxidante a luz ultravioleta desactivará el oxidante si la exposición se lleva a cabo durante un período de tiempo suficiente. En algunas realizaciones, tales períodos de tiempo pueden variar desde aproximadamente 1 milisegundo hasta aproximadamente 5 minutos. De la misma manera, la incubación de una muestra tratada con oxidante a temperatura ambiente desactivará el oxidante si la incubación se lleva a cabo durante un período de tiempo suficiente para que ocurra la degradación natural de los oxidantes en la muestra.

45 Tales períodos de tiempo pueden variar generalmente dependiendo del oxidante particular que se está usando y pueden variar típicamente desde aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 60 minutos.

La reducción química de los oxidantes también puede ser llevada a cabo por diversos métodos. Por ejemplo, un

5 agente reductor químico puede ser agregado a una muestra tratada con un oxidante antes de la adición de sondas para análisis por citometría de flujo. Tales agentes reductores pueden incluir sin limitación, glutaniona, mercaptoetanol, DTT, y similares. En otras realizaciones, la reducción química puede incluir el tratamiento de la muestra con un compuesto que contiene sulfhidrilo tal como, por ejemplo, cisteína. La cisteína puede ser ventajosa para este propósito, puesto que no tiene cromóforos y puede ser utilizada para enlazar anticuerpos a fluoróforos. Otros agentes reductores pueden ser previstos por las personas de experiencia normal en el arte.

10 Tratamiento con enzimas y/o solventes. En otras diversas realizaciones de la presente divulgación, las muestras pueden ser tratadas con una o más enzimas y/o solventes. Sin estar limitados por la teoría, se prevé que las enzimas y/o solventes pueden ayudar a proveer resultados de citometría de flujo más óptimos degradando, disociando o rompiendo muestras complejas en componentes más simples. Tales muestras complejas pueden incluir diversos alimentos (por ejemplo, mantequilla de cacahuete, helado) y especímenes biológicos (por ejemplo, esputo, sangre, suero, bilis, fluido espinal) que pueden estar en forma agregada y pueden producir señales fluorescentes no específicas sin tal tratamiento.

15 Las enzimas adecuadas para uso en la presente divulgación pueden incluir sin limitación, tripsina, quimiotripsina, pepsina, lisozima, proteasas, cisteína proteasas, fosfatasas ácidas, peroxidasas, sabinasas, proteinasa K y enzimas similares. En diversas realizaciones, tales enzimas pueden ser desactivadas subsecuentemente por dilución (por ejemplo, diluyendo 10:1 usando NaCl 150 mM u otro diluyente apropiado). Además, pueden utilizarse solventes tales como, por ejemplo, isopropanol, dimetilcarbinol propilen glicol y metil éter en diversas concentraciones para preparar muestras con matrices de alimentos o fluidos complejas con o sin tratamiento enzimático.

20 Además, tales enzimas y/o solventes pueden ser utilizados a diversos rangos de concentración. Ejemplos no limitantes de tales rangos de concentración pueden incluir desde aproximadamente 0.01% en peso hasta aproximadamente 2% en peso con respecto a la muestra en algunas realizaciones y desde aproximadamente 0.01% en peso hasta aproximadamente 50% en peso con respecto a la muestra en otras realizaciones.

25 En diversas realizaciones, las enzimas y/o solventes de la presente divulgación también pueden estar presentes en diversas composiciones, tales como en reguladores u otras soluciones. En otras realizaciones, las enzimas y/o solventes pueden estar presentes como parte de un kit de torunda como se describió previamente.

30 Las muestras de la presente divulgación pueden ser tratadas con enzimas por diversos períodos de tiempo. Tales períodos de tiempo pueden variar desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 60 minutos en algunas realizaciones y desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 30 minutos en otras realizaciones.

35 La desactivación de las enzimas es deseable por al menos tres razones que la desactivación de los oxidantes deseable antes de agregar sondas de citometría de flujo y analizar subsecuentemente. Un problema adicional que puede surgir con el uso de las enzimas es que las enzimas también pueden digerir o romper diversas sondas, tales como, por ejemplo, anticuerpos que se utilizan en diversas realizaciones de la presente divulgación. La desactivación enzimática antes de la adición de la sonda de citometría de flujo puede lograrse por diversos medios no limitantes tales como, por ejemplo, la adición de una o más enzimas inhibidoras, inactivación por calentamiento, desnaturalización, dilución o combinaciones de los anteriores. Otros métodos de desactivación enzimáticos pueden ser previstos por las personas de experiencia normal en el arte y pueden ser utilizados dentro del espíritu y alcance de los métodos de citometría de flujo presentados en la presente divulgación.

40 Digestión química. En otras realizaciones de la presente divulgación, las muestras pueden ser tratadas con uno o más agentes químicos que degradan diversas macromoléculas presentes en una muestra. Tales macromoléculas pueden interferir con el análisis de un microbio objetivo, por ejemplo. A manera de ejemplo no limitante, en algunas realizaciones, una muestra puede ser tratada con n-acetil-L-cisteína (NALC). A manera de fondo, la NALC es un agente reductor mucolítico que reduce los grupos sulfhidrilos de los enlaces disulfuro de los excretos polipeptídicos en la red macromolecular del moco. En diversas realizaciones, el agente de digestión químico puede ser desactivado antes de agregar las sondas para citometría de flujo. La NALC, por ejemplo, puede ser desactivada reduciendo el pH de la solución.

50 En un ejemplo más específico, la NALC puede ser agregada a una muestra recolectada con torunda a una concentración final de aproximadamente 1% en peso en una mezcla 1:1 de NaOH al 4% e Ix PBS (concentración final de NaOH al 2%). La mezcla puede ser llevada a cabo durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, el NALC puede ser suspendido haciendo disminuir el pH de la solución.

Citometría de flujo después de tratamiento con oxidante. En diversas realizaciones, la presente divulgación provee métodos de citometría de flujo para detectar microbios objetivo en una muestra. Los métodos que siguen incluyen etapas para tratar la muestra con un oxidante y luego desactivar el oxidante.

5 En diversas realizaciones, los métodos incluyen a) tratar la muestra con al menos un oxidante y al menos un detergente; b) desactivar el al menos un oxidante después de tratar la muestra; c) mezclar la muestra con al menos una sonda para formar una muestra etiquetada; d) introducir la muestra etiquetada en un citómetro de flujo; y e) analizar la muestra etiquetada. La al menos una sonda incluye al menos una etiqueta. La al menos una sonda se une a los microbios objetivo. La etapa de análisis incluye excitar la al menos una etiqueta mediante al menos una fuente de luz en el citómetro de flujo y detectar al menos una longitud de onda de emisión fluorescente. La divulgación adicional concerniente a las sondas y etiquetas se presenta aquí más adelante. También se presentan aquí más adelante realizaciones y detalles adicionales concernientes a los diversos métodos de citometría de flujo.

10 En diversas realizaciones, la etapa de mezcla ocurre después de la etapa de desactivación. En diversas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente tratar la muestra con al menos una enzima antes de la etapa de mezcla. En diversas realizaciones, la al menos una enzima se desactiva en la etapa de mezcla. En diversas realizaciones, la etapa de mezcla tiene lugar durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. En otras realizaciones, la etapa de mezcla tiene lugar durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de mezcla tiene lugar a concentraciones de sondas no saturadoras. Tales concentraciones de sonda no saturadoras no son convencionales en el arte. En 15 diversas realizaciones, la muestra etiquetada incluye aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5% en peso del al menos un detergente tal como, por ejemplo, Tween-80. En diversas realizaciones, la etapa de mezcla tiene lugar en la presencia de un aditivo tal como, por ejemplo, albumina de suero bovino, glicerol y combinaciones de los mismos.

20 En diversas realizaciones, la al menos una fuente de luz incluye, por ejemplo, luz ultravioleta, luz violeta, luz de xenón, luz azul y combinaciones de las mismas. En otras diversas realizaciones, la al menos una fuente de luz es una fuente de luz de infrarrojo cercano. En realizaciones en donde la al menos una fuente de luz es una fuente de luz infrarroja cercana, la detección puede estar en la región infrarroja del espectro electromagnético. En todavía otras diversas realizaciones, la al menos una fuente de luz es una fuente de luz visible tal como, por ejemplo, 25 amarilla o verde. En diversas realizaciones, la al menos una fuente de luz es un láser.

30 En diversas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente mezclar la muestra con al menos una sonda no etiquetada. La al menos una sonda no etiquetada se dirige a al menos un componente microbiano no objetivo de la muestra. Los componentes microbianos no objetivo de la muestra incluyen sin limitación microorganismos no objetivo indeseados, proteínas indeseadas, residuos celulares, objetos autofluorescentes y combinaciones de los mismos. El uso de sondas no etiquetadas puede enmascarar sitios dentro de componentes microbianos no objetivo que de otra manera darían una señal falsa cuando se agregan las sondas etiquetadas.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente optimizar el rendimiento del citómetro de flujo antes de la etapa de análisis. En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente estandarizar el rendimiento del citómetro de flujo contra el rendimiento de un segundo citómetro de flujo.

35 En otras diversas realizaciones, la presente divulgación provee diversos métodos de citometría de flujo para detectar microbios en una muestra. Tales métodos pueden incluir 1) tratar la muestra con diversas combinaciones de oxidantes, detergentes, enzimas y combinaciones de los mismos; 2) desactivar los oxidantes y/o enzimas; 3) mezclar la muestra con una o más sondas que tengan una o más etiquetas fluorescentes; 4) introducir la muestra en un citómetro de flujo; y 5) analizar la muestra excitando las etiquetas fluorescentes sobre las sondas mediante una o 40 más fuentes de luz tales como, por ejemplo, luz ultravioleta, luz visible, luz violeta, luz de xenón, luz azul y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la mezcla puede tener lugar en rangos de concentración de sonda no saturadores durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. En otras realizaciones, la mezcla puede tener lugar durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 20 minutos. Tales etapas de mezcla pueden tener lugar en la presencia de aditivos tales como, por ejemplo, proteínas estabilizadoras (por ejemplo, albúmina de suero bovino), aditivos de estabilización (por ejemplo, glicerol) y 45 combinaciones de los mismos.

50 Sondas, etiquetas y citómetros de flujo: De acuerdo con los métodos de citometría de flujo de la presente divulgación, los microbios objetivo de diversas muestras pueden ser sondeados por diversos métodos y reactivos de sondeo. Las muestras sondeadas son analizadas por varias técnicas analíticas por citometría de flujo. En diversas realizaciones, el sondeo puede ocurrir antes, durante o después de cualquier etapa de recolección o tratamiento de muestra. Tal sondeo puede ocurrir también sin el tratamiento de las muestras.

55 En diversas realizaciones de la presente divulgación, los métodos de citometría de flujo utilizan al menos una sonda. En diversas realizaciones, las sondas pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y combinaciones de los mismos), sondas de ARN, sondas de ADN, colorantes de ADN (por ejemplo tiazol naranja, yoduro de propidio, LDS-751), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), aptámeros, moléculas pequeñas, moléculas biomiméticas, fagos virulentos, y similares. Una sonda individual puede ser utilizada para sondear la muestra, o puede usarse una combinación de dos o más sondas.

5 Las sondas usadas en los métodos de citometría de flujo descritos aquí pueden incluir al menos una etiqueta que va a ser usada para la detección de señales en el citómetro de flujo. Tales etiquetas son moléculas o especies similares que emiten luz de una longitud de onda o de un rango de emisión de longitud de onda conocidos después de la citación mediante una fuente de energía (por ejemplo, una fuente de luz). Etiquetas ilustrativas adecuadas para poner en práctica las diversas realizaciones de la presente divulgación incluyen, sin limitación, moléculas fluorescentes, colorantes, puntos cuánticos, partículas de oro, esferas de quantum y similares. Ejemplos de tales etiquetas son bien conocidos para las personas de experiencia normal en el arte.

10 En un ejemplo no limitante las moléculas fluorescentes excitadas por la luz azul que tienen una longitud de onda de 488 nm pueden ser utilizadas como etiquetas en diversas realizaciones de la presente divulgación. En algunas realizaciones, tales moléculas fluorescentes emiten en las regiones de recuento FL-1, FL-2, FL-3 y/o FL-4 (esto es, canales de detección) de un citómetro de flujo. Ejemplos ilustrativos de tales moléculas fluorescentes aparecen en la lista en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Etiquetas de moléculas fluorescentes ilustrativas que emiten en FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4

Nombre	PM (Daltons, Da)	Excitación láser λ (nm)	Pico de emisión (nm)	Intensidad (1=más baja, 5=más alta)	Canales de detección (los más comunes)
FITC (isotiocianato de fluoresceína)	389	488	518	3	FL-1
ALEXA FLUOR 488	643	488	519	3	FL-1
R-PE (R-ficoeritrina)	240K	488	575	5	FL-2
PE-Rojo de Texas	243K	488	615	3	FL-3
PE-ALEXA FLUOR 610	242K	488	628	3	FL-3
PE-Cy5	242K	488	670	4	FL-3 o FL-4
PE-Cy5.5	242K	488	690	3	FL-3 o FL-4
PerCP-Cy5.5	35K	488	690	3	FL-3 o FL-4
PE-Cy7	242K	488	760	3	Con base en el instrumento
7-ADD	1270	488	647		FL-3
Yoduro de propidio (PI)	668	488	617		FL-2 y FL-3

15 Ejemplos ilustrativos de puntos cuánticos adecuados para poner en práctica las diversas realizaciones de la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, EviTag Water Soluble Quantum Dot Labels. Un amplio rango de etiquetas con puntos cuánticos adecuados están disponibles comercialmente en una serie de proveedores, incluyendo Invitrogen, Sigma, y Molecular Probes.

20 Después de mezclar las muestras con diferentes sondas bajo condiciones de sondeo adecuadas, las muestras pueden ser analizadas por diversos métodos analíticos de citometría de flujo. Tales análisis pueden tener lugar utilizando diversos citómetros de flujo comerciales. Ejemplos no limitantes de citómetros de flujo adecuados incluyen sin limitación, el citómetro de flujo de Becton Dickinson FACScan, el Beckman Coulter EPICS Altra, los sistemas de citometría de flujo de Cytomics FC 500, la serie de citómetros de flujo Apogee A40 (por ejemplo, A40-MiniFCM), los citómetros de flujo Beckman-Coulter Quanta SC, Becton Dickinson FACSCalibur, Accuri C6 Flow Cytometer, Microcyte por Optoflow AS, el Partec PAS III, y otros equipos similares. Los diversos métodos de sondeo y analíticos por citometría de flujo adecuados para poner en práctica otras diversas realizaciones de la presente divulgación

25

serán descritos ahora en más detalle.

Concentraciones de sonda típicas. En algunas realizaciones de la presente divulgación, la concentración de la sonda es menor que la concentración de saturación del microbio objetivo (esto es, rangos de concentración no saturadores). En diversas realizaciones, la concentración de las sondas está a un nivel mínimo suficiente para alcanzar un resultado significativo estadísticamente cuando la muestra sondeada es probada por los métodos de citometría de flujo descritos aquí. Por ejemplo, la concentración de las sondas es suficiente para detectar los microbios objetivo pero no lo suficientemente grande para interactuar con microorganismos no objetivo. De la misma manera, tales concentraciones de sonda mínimas también pueden referirse generalmente a concentraciones de sonda donde el número de moléculas de sonda disponibles es sustancialmente menor que el número de microbios objetivo dentro de una muestra. En otras realizaciones, tales concentraciones mínimas de sonda pueden también referirse en general a concentraciones de sonda que están por debajo de los rangos de concentración estándar que se utiliza comúnmente para una sonda en particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las concentraciones mínimas de sonda pueden variar desde aproximadamente 1.000 veces hasta aproximadamente 1.000.000 de veces por debajo de la concentración estándar utilizada comúnmente para la sonda en particular. Los rangos de concentración usados comúnmente de tales sondas en citometría de flujo serán reconocibles por las personas que tengan experiencia normal en el arte. Más específicamente, una concentración mínima para una sonda de anticuerpo monoclonal puede variar en algunas realizaciones desde aproximadamente 1 pg/ml hasta aproximadamente 0.01 pg/ml. El rango de concentración de anticuerpo mínimo antes mencionado puede producir un rango dinámico del método de aproximadamente 10 células objetivo/ml hasta aproximadamente 10^6 células objetivo/ml.

Sin estar limitados por ninguna teoría, se prevé que el uso de concentraciones mínimas de sonda puede reducir el enlazamiento no específico a microbios objetivo y los componentes de microbios no objetivo de la muestra que puede presentarse a concentraciones de sonda más altas. Por ejemplo, el uso de concentraciones diluidas de anticuerpo para un epítipo de célula bacteriana puede sacrificar un rango dinámico lineal enlazándose para el recuento de objetivos de concentración alta en favor de un conteo óptimo de especies objetivo de concentración baja. Bajo tales condiciones, los microbios no objetivo con reactividad cruzada, incluso cepas relacionadas con los microbios objetivo, pueden no ser etiquetadas tan eficientemente como las cepas de microbio objetivo, haciendo por lo tanto que los microbios no objetivo reactivos caigan por fuera de la región de recuento de los microbios objetivo en un histograma de citometría de flujo. Ventajosamente, tales métodos pueden reducir o eliminar los resultados falso positivos, lo que puede ser deseable para ensayos en los cuales la sensibilidad y/o selectividad para el microbio objetivo puede ser solamente de una célula (por ejemplo, *E. coli* 0157 en una muestra).

Aditivos estabilizadores. Un problema que puede surgir con el uso de concentraciones mínimas de sonda es la estabilidad de las sondas. Por ejemplo, a concentraciones diluidas, muchas sondas pueden aglomerarse con el tiempo y/o precipitar. Tales problemas pueden ocurrir particularmente cuando la sonda es una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, un anticuerpo. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente divulgación las soluciones de sondas diluidas pueden estabilizarse mediante el uso de proteínas y/o otros aditivos de estabilización. Ventajosamente, el uso de aditivos y/o proteínas de estabilización con concentraciones diluidas de proteína pueden hacer posible la manufactura de reactivos y/o kits con vidas útiles prolongadas.

En diversas realizaciones, las proteínas y aditivos de estabilización antes mencionados son no fluorescentes o sustancialmente no fluorescentes a la longitud de onda de detección de interés. También es ventajoso que tales proteínas y aditivos de estabilización no interfieran de manera sustancial con las actividades de enlazamiento de las sondas a los microbios objetivo. Ejemplos no limitantes de proteínas adecuadas pueden incluir sin limitación albúmina de suero bovino (BSA), albumina de suero humano, ovalbúmina, caseína y proteínas similares. Ejemplos no limitantes de aditivos estabilizadores pueden incluir sin limitación osmolitos (por ejemplo, trehalosa, trimetil amina n-óxido (TMAO)), citratos, oxalatos, polietilén glicol (PEG), ditiotreitól (DTT), glicerol, 2-mercaptoetanol, ácido etilén diamino tetraacético (EDTA), ácido etilénbis (oxietilén nitrilo)-tetraacético (EGTA), y moléculas similares.

Tiempos de sondeo. En otras realizaciones de la presente divulgación, una o más sondas pueden ser mezcladas con una muestra durante un período de tiempo breve. Tales períodos de tiempo breve pueden variar desde aproximadamente 15 segundos hasta aproximadamente 15 minutos en algunas realizaciones, y desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos en otras realizaciones. Sin estar limitados por la teoría, se prevé que el uso de tiempos de sondeo breves puede reducir el enlazamiento no específico de las sondas a componentes microbianos no objetivo de la muestra, reduciendo por lo tanto los resultados de falsos positivos. Sin embargo, el uso de tales tiempos de sondeo breves son todavía suficientes para que la sonda se enlace específicamente a su microbio objetivo. Tales tiempos de sondeos breves pueden combinarse con concentraciones de sondeo no saturadoras referenciadas más arriba.

Un problema que puede surgir con tiempos de sondeo breve es que la eficiencia en el enlazamiento a un objetivo específico puede ser baja, poniendo por lo tanto en riesgo la detección. Los solicitantes prevén que los períodos de enlazamiento que van desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 60 segundos pueden ser suficientes para al menos el análisis cualitativo de enlazamiento específico a un microbio objetivo utilizando análisis

por citometría de flujo. De la misma forma, los Solicitantes prevén que los periodos de enlazamiento que van desde aproximadamente 60 segundos hasta aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 20 minutos pueden ser suficientes para el análisis cuantitativo del enlazamiento en un citómetro de flujo (por ejemplo, detección y recuento de bacterias objetivo). En otras diversas realizaciones de la presente divulgación, se utilizan tiempos de sondeo de aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 20 minutos. Tales tiempos de sondeo durante una etapa de mezcla pueden ser utilizados ventajosamente para análisis tanto cualitativos como cuantitativos según lo desee el operador.

Bloqueo de epítomos no objetivo. En otras realizaciones de la presente divulgación, se pueden reducir o eliminar sustancialmente resultados de falsos positivos mediante el uso de sondas no etiquetadas que son específicas para epítomos no etiquetados, tales como uno o más componentes microbianos no objetivo de una muestra. Tales sondas no etiquetadas no contienen al menos una etiqueta tal como, por ejemplo, un fluoróforo. En algunas realizaciones, se puede mezclar una muestra con una o más sondas no etiquetadas que se enlazan específicamente a los epítomos de microbios no deseados. Después de esto, la muestra puede ser mezclada con una o más sondas etiquetadas que son específicas para un microbio de interés. En realizaciones adicionales, las muestras pueden ser mezcladas con las sondas etiquetadas y no etiquetadas al mismo tiempo. En otras realizaciones, también pueden incluirse sondas desviadas etiquetadas.

Sin estar limitados por la teoría, se prevé que tales sondas no etiquetadas se unen a sus objetivos designados (por ejemplo, un epítomo reactivo cruzado o un microbio indeseado) y bloqueen el enlazamiento de las sondas etiquetadas a esos epítomos. Por lo tanto, el uso de sondas no etiquetadas puede no interferir sustancialmente con el enlazamiento de sondas etiquetadas a sus epítomos objetivo.

En diversas realizaciones, el uso de sondas no etiquetadas puede ser utilizado en métodos de Identificación de Objetivo Equivalente en Panel, métodos de triangulación fuera de objetivo, y cualquier otro método de citometría de flujo para detectar microbios objetivo divulgado aquí.

Filtración electrónica. También pueden surgir problemas en la detección de microbios con muchas muestras que contienen solamente pocos microbios objetivo de interés. En particular, el número total de eventos detectados durante un análisis de citometría de flujo típico puede variar frecuentemente desde aproximadamente 25.000 hasta aproximadamente 100.000 eventos. Para muchas muestras, los microbios objetivo pueden representar solamente un número muy pequeño del número total de eventos detectados. Adicionalmente, otras partículas pequeñas (por ejemplo, polvo, proteínas pequeñas, partículas pequeñas y similares) dentro de una muestra pueden poseer una o más de las características típicas de un microbio objetivo de interés. Las señales provenientes de tales partículas (denominadas aquí como "ruido químico" o "ruido aleatorio") pueden oscurecer frecuentemente la detección de un microbio objetivo de interés en una muestra, particularmente cuando hay solamente muy pocos microbios objetivo en la muestra (por ejemplo, menos de aproximadamente 50 bacterias objetivo en algunas realizaciones y menos de aproximadamente 10 bacterias en otras realizaciones).

En diversas realizaciones, la presente divulgación también provee métodos para identificar de manera más efectiva microbios objetivo dentro de una muestra. Tales métodos que incluyen técnicas para seleccionar eventos y eliminar no eventos de citometría de flujo se denominan aquí como "Filtración Electrónica". En diversas realizaciones, los métodos de Filtración Electrónica pueden utilizar una lógica de salida en serie de citometría de flujo para lograr la reducción del ruido químico y el aislamiento de la señal del objetivo.

La figura 8 representa un esquema que muestra una realización ilustrativa de la Filtración Electrónica para optimizar el rendimiento de un citómetro de flujo. En estas realizaciones, la sensibilidad de cada canal del detector de citometría de flujo fue reducida al hacer disminuir el voltaje de fotomultiplicador (PMT) (esto es, la ganancia) al nivel mínimo suficiente para detectar eventos provenientes de microbios objetivo. Incluso en esta selección de PMT más bajo, el ruido químico y el aleatorio no son separados discretamente de la señal verdadera. Haciendo referencia a todos los parámetros de canal para cada evento, como se registra en el tiempo, la combinación de todos los canales puede ser utilizada para discriminar ruido químico y/o electrónico a partir de la señal verdadera de los microbios objetivo. Por ejemplo, los canales de detección utilizados pueden incluir FSC, SSC, FL-1, FL-2, y FL-3. Los valores de umbral para cada canal de detección son fijados, con lo cual las salidas del canal de detección de un valor inferior son excluidas de consideración. En la realización mostrada en la figura 8, los valores umbral para FSC y SSC fueron fijados a 0.2, mientras que los valores umbral para FL-1, FL-2 y FL-3 fueron fijados a 0.05. Cada uno de los datos dentro de un intervalo de tiempo recolectados fueron registrados a través de un sello de tiempo representado en la primera columna de las tablas en la figura 8. Tales datos incluían señales de los microbios objetivo así como no señales de cada uno de los canales de detección. A continuación, los intervalos de registro de tiempo donde las señales de uno de los canales no excedía ninguno de los valores de umbral asignados fueron considerados como "no eventos" y eliminados. De la misma manera, los intervalos de tiempo donde las señales de cada uno de los canales excedían el valor umbral asignado fueron seleccionados para análisis posterior. ≥

Una persona de experiencia normal en el arte reconocerá que la Filtración Electrónica tal como se describió aquí

más arriba puede incluir diversas realizaciones. Por ejemplo, el criterio de selección que es utilizado para eliminar diversos intervalos de tiempo puede variar en diferentes realizaciones. De la misma manera, en diversas otras realizaciones, la sensibilidad de los canales de detección en un citómetro de flujo puede o puede no ser reducida. Por ejemplo, en vez de reducir la sensibilidad al reducir la ganancia, la sensibilidad puede ser incrementada incrementando la ganancia. Aunque puede incrementarse el ruido electrónico al incrementar la ganancia, tal ruido electrónico puede ser filtrado de la señal de muestra utilizando los protocolos de salida en serie divulgados aquí. De la misma manera en todavía otras realizaciones, la sensibilidad de los canales de detección en un citómetro de flujo puede ser incrementada incrementando el voltaje de un tubo fotomultiplicador. Adicionalmente, en todavía otras realizaciones, la sensibilidad puede ser incrementada incrementando tanto la ganancia como el voltaje del tubo fotomultiplicador. En todavía realizaciones adicionales, pueden utilizarse canales de detección menores o adicionales. Adicionalmente, tales canales de detección pueden ser asignados con diferentes valores de umbral. En diversas realizaciones, la filtración electrónica puede ser llevada a cabo manualmente. En otras realizaciones, la filtración electrónica puede ser llevada a cabo automáticamente.

Análisis de muestras complejas. Pueden surgir problemas especiales en los análisis por citometría de flujo cuando las muestras que se van a analizar contienen numerosos fluoróforos. Ejemplos no limitantes de tales muestras complejas pueden incluir alimentos (por ejemplo, mantequilla de cacahuete, vegetales, helados), fluidos biológicos (por ejemplo, esputo, orina, sangre), y similares. A manera de fondo, muchos alimentos tiene color y producen alguna fluorescencia natural cuando se excitan con una longitud de onda similar a la usada en el análisis. Por lo tanto, muchas muestras de alimento así como muestras biológicas complejas pueden mostrar emisión en los canales de detección FL-1, FL-2 y FL-3 por excitación con luz azul (tal como se utiliza en citómetros de flujo). Más particularmente, las muestras de alimentos basados en vegetales tales como espinacas pueden tener compuestos autofluorescentes, tales como clorofila, que pueden emitir luz en la región de recuento de FL-3 después de la excitación. De la misma manera, muchas muestras de alimentos pueden ser ricas en proteínas que pueden emitir luz en las regiones de recuento de FL-2 y FL-3 con desplazamientos de Stokes típicamente pequeños.

Por lo tanto, en diversas realizaciones de la presente divulgación, el ruido químico proveniente de tales muestras complejas puede ser reducido o eliminado excitando la muestra con una fuente de energía más alta. Ejemplos no limitantes de tales fuentes puede incluir sin limitación luz ultravioleta, luz violeta, luz de xenón, luz de infrarrojo cercano y similar. Sin estar limitados por la teoría, los Solicitantes creen que el uso de tales fuentes de luz puede reducir y/o eliminar las señales de fondo porque algunos o muchos de los fluoróforos en muestras complejas pueden no ser excitados fluorescentemente por tales fuentes alternativas de luz. También se puede prever que algunos componentes de muestra complejos pueden absorber las fuentes de luz antes mencionadas pero emitirían en una región del espectro (UV, violeta, o azul) que puede no ser usada para la detección.

Otras medidas también pueden ser adecuadas para presentar señales de fondo de muestras complejas, bien sea individualmente o en combinación con las etapas antes mencionadas. Por ejemplo, si una o más de las sondas que se va a utilizar para análisis incluye puntos cuánticos, partículas de oro, esferas de quantum y/o otras etiquetas complejas, puede ser posible para tales etiquetas ser conjugadas a las sondas a niveles de concentración que son sustancialmente menores que las concentraciones de sonda. Tales medidas pueden ayudar a eliminar grumos y/o agregados de etiquetas que pueden contribuir a señales de fondo. En diversas realizaciones, tales rangos de concentración pueden incluir rangos de concentración que colocan la relación molecular de sonda a etiqueta entre aproximadamente 0.25 hasta aproximadamente 1 (por ejemplo, 0.25 moléculas de anticuerpo por una molécula de punto cuántico, por ejemplo). Otras maneras de reducir las señales de fondo de muestras complejas puede ser procesar las muestras por una o más de las etapas de tratamiento descritas previamente o mediante el uso de kits de torunda como se describió previamente para recolectar y tratar las muestras.

Kits y compilaciones. La presente divulgación también describe diversas realizaciones de kits o compilaciones que permiten a los usuarios utilizar los diversos aspectos de la presente divulgación de una manera efectiva y conveniente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación puede proveer un sistema que incluye cualquier combinación de lo siguiente: (1) kits de torundas; (2) sondas específicas para un microbio de interés; (3) software pertinente a la instrumentación para citometría de flujo, lógica de salida, adquisición de datos, entrada de ID de muestra escaneada, postprocesamiento y/o despliegue; (4) manuales de instrucción; (5) equipo relacionado con BBI, incluyendo perlas e instrucciones de calibración; (6) estándares de control positivos para microbios de interés; y (7) instrucciones y/o especificaciones asociados con la preparación de reactivos, formulación de reactivos, desarrollo del ensayo, prueba y otras selecciones.

En realizaciones adicionales, la presente divulgación provee diversos kits que permiten a los usuarios usar las diversas realizaciones presentes en una manera efectiva y conveniente. En algunas realizaciones, tales kits pueden incluir un primer juego de sondas y un segundo juego de sondas, en donde el primer juego de sondas incluye una primera sonda con una primera etiqueta, y un segundo juego con una segunda etiqueta. De la misma manera, el segundo juego de sondas puede incluir una primera sonda con la segunda etiqueta, y una segunda sonda con la primera etiqueta. En esta realización, la primera etiqueta y la segunda etiqueta tienen rangos de emisión de longitud de onda diferente.

5 En otras realizaciones de la presente divulgación, los kits pueden incluir diferentes conjuntos de reactivos para la detección de microbios objetivo. Tales kits también pueden contener protocolos especializados que son pertinentes al uso de tales reactivos. Tales variaciones pueden ser aplicables si el usuario no obtiene resultados óptimos después de la utilización de un conjunto de reactivos. Después de esto, el usuario puede simplemente conmutar el conjunto de reactivos que está siendo utilizado para obtener mejores resultados.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un kit puede proveer a un usuario con una primera sonda y una segunda sonda. La primera sonda puede tener una primera etiqueta y la segunda sonda puede tener una segunda etiqueta. En esta realización, la primera sonda puede ser la misma que la segunda sonda y/o enlazarse al mismo objetivo. Sin embargo, la primera etiqueta y la segunda etiqueta pueden tener diferentes rangos de emisión de longitud de onda.

10 En algunas realizaciones, la primera sonda puede ser un anticuerpo etiquetado con FL-1 específico para un microbio de interés (por ejemplo, primera sonda). Por el contrario, la segunda sonda puede ser el mismo anticuerpo que esta anexado a una etiqueta FL-3. Además, el kit puede instruir al usuario sobre cómo conmutar de la primera sonda a la segunda sonda en el evento de que el usuario observe señales de fondo significativas en un despliegue 2-D. La figura 10 representa gráficas de emisión de citometría de flujo ilustrativas que muestran como el ruido en una región

15 de detección puede no estar presente en otra región de detección. Por ejemplo, como se muestra en la gráfica 1000 de emisión, ambas señales específicas A y señales de fondo B fueron observadas en la región de recuento FL-1. Sin embargo, como se muestra en la gráfica 1010 de emisión, el uso alternativo de una sonda etiquetada con FL-3 para el microbio desplaza la señal A a la región de recuento de FL-3 desde la señal B de fondo en la región de recuento FL-1. Por lo tanto, si el usuario detecta señales B de fondo significativas en la región de recuento FL-1 después de sondear el microbio de interés con la primera sonda etiquetada FL-1, el usuario puede seguir las instrucciones y conmutar a la segunda sonda.

En otras diversas realizaciones, puede desarrollarse un kit similar para ensayos de viabilidad bacteriana. Por ejemplo, tal kit puede contener un primer conjunto de colorantes de ADN para detectar células viables en la región de recuento FL-1 y células no viables en la región de recuento FL-3. Además, el kit también puede contener un

25 segundo conjunto de colorantes de ADN para detectar células viables en la región de recuento FL-3 y células no viables en la región de recuento FL-1 en el evento de que el primer conjunto de colorantes provea al usuario con señales de fondo significativas. Tal kit también puede contener protocolos acerca de cómo usar los diferentes conjuntos de reactivos.

En todavía otras diversas realizaciones de la presente divulgación, un kit puede incluir un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas. En esta realización, el primer conjunto de sondas puede incluir una primera sonda con una primera etiqueta y una segunda sonda con una segunda etiqueta. De la misma forma, el segundo conjunto de sondas puede incluir una tercera sonda con la segunda etiqueta y una cuarta sonda con la primera etiqueta. En algunas realizaciones, la primera sonda puede ser un anticuerpo para un microbio, y la primera etiqueta puede emitir en FL-1. De la misma forma, la segunda sonda puede ser una "sonda desviada" (como se describió previamente), y la segunda sonda puede emitir en FL-3. Además, la tercera sonda puede ser el mismo anticuerpo de la primera sonda excepto que la segunda etiqueta emite en FL-3. De la misma forma, la cuarta sonda puede ser la misma sonda desviada que la segunda sonda con la primera etiqueta que emite en FL-1.

30

35

El uso de tales kits puede ser particularmente aplicable cuando se desea detectar bacterias en alimentos. A manera de fondo, los alimentos tienen color y fluorescencia natural. Además, el alimento puede tener partículas en un rango de tamaño de células bacterianas que pueden emitir colores cuando se excitan. Por ejemplo, los vegetales verdes contienen clorofilas que emiten en la región de recuento FL-3 pero no en la región de recuento FL-1. Por lo tanto, un ensayo para bacterias en espinaca, por ejemplo, que cuenta la emisión en FL-1 y utiliza FL-3 para el canal de desvío no experimentará interferencia proveniente de la matriz del alimento. Sin embargo, componentes saborizantes y naturales en pollo cocinado pueden frecuentemente mostrar emisión de fondo en el canal FL-1 pero no en el canal

40

45 FL-3. Por lo tanto, para el análisis efectivo de tales elementos, un kit puede contener un conjunto de sondas para un microbio de interés que está etiquetado con moléculas que emiten luz en la región de recuento FL-1. De la misma forma, el mismo kit puede contener otro conjunto de las mismas sondas que esta etiquetado con moléculas que emiten luz en la región de recuento FL-3. El kit también puede contener protocolos acerca de cómo usar los diferentes conjuntos de reactivos.

50 Aplicaciones. Una persona de experiencia normal en el arte reconocerá que los numerosos aspectos de la presente divulgación pueden ser combinados en diferentes variaciones para proveer sistemas y métodos basados en citometría de flujo útiles para la detección microbiana. Tales sistemas y métodos pueden permitir que los usuarios detecten, caractericen y cuantifiquen microbios de interés en tiempo real a partir de diversas muestras, tales como alimentos, especímenes biológicos, objetos diversos, fuentes de agua y similares. Además, tales sistemas no requieren el uso de técnicas de cultivo celular o amplificación de ADN/ARN. De acuerdo con lo anterior, se pueden prever numerosas aplicaciones de cualquiera de las diversas realizaciones de la presente divulgación.

55

Por ejemplo, los sistemas y métodos de la presente divulgación pueden permitir que el personal profesional en cuidado de salud responda más efectivamente a casos que son pertinentes a contaminación con alimentos o epidemias. Tales sistemas y métodos también pueden ser utilizados para ensayos direccionados en tiempo real para

detectar armas biológicas. También se puede prever el uso de los sistemas y métodos de la presente divulgación en ensayos específicos de patógenos para detectar microbios, tales como, por ejemplo, *E. coli* 0157, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. De la misma manera, tales sistemas y métodos pueden permitir la detección en tiempo real de células TB en esputo, sin requerir semanas de incubación celular.

5 Ejemplos experimentales

Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar de manera más completa algunas de las realizaciones divulgadas aquí anteriormente. Es evidente para las personas experiencia normal en el arte que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas que constituyen modos de ejemplo para la práctica de la divulgación. Las personas de experiencia normal en el arte deberían apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que están divulgadas y obtener todavía un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la divulgación.

En los ejemplos que siguen, los métodos de citometría de flujo definidos más arriba aquí se denominan colectivamente como métodos RAPID-B o LRB.

Ejemplo 1: Evaluación por citometría de flujo de *E. coli* en ensalada empacada, masa para galletas y salami. Se obtuvieron ensalada empacada, masa para galletas y salami de diversos mercados de víveres. Cada muestra fue preparada para probar de acuerdo con el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (BAM) Capítulo 4a el día antes de la prueba. Todos los pesos de las muestras preparadas fueron de 25 gramos, pesados antes de la inoculación o de la adición de caldo de enriquecimiento. Todas las muestras para un producto dado fueron "procesadas", manipuladas y probadas como un lote individual. El BAM especifica una proporción de 9:1 de medio de crecimiento a muestra como se observó en todas las pruebas. El caldo de enriquecimiento EHEC mTSB (caldo de triticasa soya modificado, Opción 1 BAM) fue utilizado para todas las pruebas de referencia. Los niveles de inoculación por siembra fueron verificados mediante un arreglo de 5 placas 5 PCA para cada nivel de inoculación; los niveles de inoculación fueron calculados con base en el promedio de los resultados del arreglo.

Todas las muestras de producto fueron sembradas con la *E. coli* 0157:H7, código de referencia ATCC 43888 no productora de la toxina Shiga. Las muestras de salami y ensalada empacada fueron cortadas primero porque un empaquetamiento rápido sin corte, como se especifica en el BAM, no da como resultado consistentemente una homogeneidad de la muestra. Se utilizaron procedimientos de manipulación aséptica en todo el procesamiento. Las muestras de producto fueron agregadas a bolsas de filtración Whirlpak® e inoculadas con 100 µL de *E. coli* 0157 ATCC 43888. Las muestras fueron añejadas durante 4 horas según la guía del Food Emergency Response Network (FERN) nivel 2, seguida por la adición de 225 mL de caldo de enriquecimiento (mTSB para muestras de referencia o caldo tripticasa soya (TSB) para muestras RAPID-B). Las muestras fueron empaquetadas durante 5 minutos y colocadas en una incubadora a 37°C para crecimiento nocturno. Todas las muestras fueron preparadas y colocadas al mismo tiempo en la misma incubadora después de 30 minutos de la preparación.

Después de crecimiento nocturno, cada bolsa Whirlpak® fue agitada ligeramente y luego se tomo una alícuota de 1 mL de cada una. La muestra de 1 mL para la prueba de citometría de flujo RAPID-B fue filtrada a través de un filtro de 5 µm antes de preparar las diluciones LOG. Las diluciones seriadas LOG fueron preparadas de la misma manera para RAPID-B y para el método de referencia como sigue: el volumen de 1 mL fue agregado a 9 mL de solución salina regulada con fosfato, repetido en serie, hasta el 4º LOG. Las placas extendidas para el método de referencia utilizaron un volumen de muestra de 100 µL sobre placas TCSMAC (total 4 placas a partir de tres diluciones). Adicionalmente, una placa de extensión TCSMAC fue preparada para cada muestra. Las placas que exhibieron crecimiento de colonias fueron procesadas adicionalmente de acuerdo con los métodos BAM para generar resultados confirmados "positivos" o "negativos". Las muestras RAPID-B fueron preparadas agregando 100 µL de muestra diluida LOG a 900 µL de solución salina regulada con fosfato, 240 µL de sonda B fluorescente y 10 µL de sonda A fluorescente (generando un total de volumen preparado de 1.25 mL). La muestra RAPID-B preparada fue sometida a vórtex durante 10 minutos antes del análisis del volumen preparado de 1.25 mL. Cada una de estas muestras de 1.25 mL produjeron tres ensayos en replicado que permitieron un establecimiento burdo de la homogeneidad de la muestra y la consistencia de análisis a análisis para los resultados.

Los análisis por citometría de flujo fueron llevados a cabo como sigue: la mezcla de muestra fue cargada sobre un citómetro de flujo que había sido calibrado previamente con un protocolo de salida de *E. coli* 0157. En cada análisis por citometría de flujo RAPID-B, se aspiraron 200 µL de muestra hacia el instrumento (aproximadamente 30 segundos). Se analizó un volumen de 100 µL por parte del instrumento a una tasa de flujo de 100 µL/minuto. Los recuentos bacterianos en la región objetivo de "*E. coli* 0157 viva" fueron registrados y el Análisis fue salvado para observación posterior. Se llevaron a cabo otras purgas (definición instrumental estándar, aproximadamente 45 segundos de tiempo total para las tres purgas) entre los análisis. Subsecuentemente, se analizan dos replicados adicionales de la muestra preparada, produciendo 3 ensayos en total para cada muestra. Se utilizó un umbral de 10 recuentos (por ejemplo sustraído de los recuentos reportados).

Los resultados de las pruebas para la ensalada empacada, masa para galletas y salami se resumen en las Tablas 4-

- 5 6. Las figuras 11A-11C representan gráficas de emisión por citometría de flujo con salida ilustrativas obtenidas por los métodos RAPID-B para matrices de ensalada empacada (figura 11A), masa para galletas (figura 11B) y salami (figura 11C) En resumen, los métodos de citometría de flujo RAPID-B identificaron correctamente todas las muestras positivas y negativas generando una tasa de sensibilidad global de 1.0 y una tasa de falsos negativos de 0.00 para las tres matrices de producto. Comparativamente, el Método de Referencia produjo una tasa de sensibilidad de 0.83 y una tasa de falsos negativos de 0.17 para las mismas matrices de producto. Estos resultados indican que los métodos RAPID-B son superiores que el Método de Referencia.

Tabla 4. Prueba de *E. coli* 0157 de ensalada empacada utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Marca	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo		Recuento celular LRB		
						Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
S-1	DOLE-TG	25	225	0	0	-	-	0	0	0
S-2	DOLE-TG	25	225	6	6	-	-	204	243	221
S-3	DOLE-TG	25	225	70	70	-	-	482	521	513
S-4	DOLE-TG	25	225	0	0	-	-	0	1	1
S-5	DOLE-TG	25	225	6	6	-	-	52	54	65
S-6	DOLE-TG	25	225	70	70	-	-	70	63	72
S-7	DOLE-7L	25	225	0	0	-	-	1	1	2
S-8	DOLE-7L	25	225	6	6	-	-	973	1014	1030
S-9	DOLE-7L	25	225	70	70	-	-	8470	8772	8565
S-10	F.E.-Ital	25	225	0	0	-	-	0	0	0
S-11	F.E.-Ital	25	225	6	6	-	-	48	53	45
S-12	F.E.-Ital	25	225	70	70	-	-	775	876	774
S-13	F.E.-5	25	225	0	0	-	-	1	1	1
S-14	F.E.-5 Lmix	25	225	6	6	-	-	97871	97026	97108
S-15	F.E.-5 Lmix	25	225	70	70	-	-	110690	153208	131376
S-16	F.E.-Amer	25	225	0	0	-	-	2	2	0

Resultado cualitativo							Recuento celular LRB			
ID	Marca	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
S-17	F.E.-Amer	25	225	6	6	-	-	1533	1508	1531
S-18	F.E.-Amer.	25	225	70	70	-	-	36488	38270	40599
SN	SN	0	225	0	0	-	-	1	0	1

Tabla 5: Prueba de *E. coli* 0157 de masa para galletas usando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID de muestra	Sabor de la masa	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB		
						Resultado BAM final	Resultado LRB final	Resultado LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3	
CD-1	Sug	25	225	0	0	-	-	0	0	0	0
CD-1	Sug	25	225	5	5	+	+	170	177	209	209
CD-3	Sug	25	225	65	65	+	+	2507	2545	2652	2652
CD-4	PB	25	225	0	0	-	-	1	1	1187	1187
CD-5	PB	25	225	5	5	+	+	159	196	187	187
CD-6	PB	25	225	65	65	+	+	1141	1141	11400	11400
CD-7	CC	25	225	0	0	-	-	1	0	0	0
CD-8	CC	25	225	5	5	+	+	355			
CD-9	CC	25	225	65	65	+	+	4533	4686	4738	4738
CD-10	OMRais	25	225	0	0	-	-	1	0	1	1
CD-11	OMRais	25	225	5	5	+	+	289	242	276	276
CD-12	OMRais	25	225	65	65	+	+	794	800	857	857
CD-13	SugP	25	225	0	0	-	-	1	0	0	0
CD-14	SugP	25	225	5	5	+	+	747	748	781	781
CD-15	SugP	25	225	65	65	+	+	3051	2984	3088	3088

ID de muestra	Sabor de la masa	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB			
						Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB analisis 1	LRB analisis 2	LRB analisis 3		
CD-16	CinSug	25	225	0	0	-	-	0	0	2		
CD-17	CinSug	25	225	5	5	+	+	1368	1386	1475		
CD-18	CinSug	25	225	65	65	+	+	8194	13488	16687		
SN		0	225	0	0	-	-	0	0	0		

Tabla 6: Prueba de *E. coli* 0157 de salami usando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Sabor de salami	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB		
						Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3	
SM-1	Hormel	25	225	0	0	-	-	1	1	2	
SM-2	Hormel	25	225	9.6	9.6	+	-	9552	10211	10262	
SM-3	Hormel	25	225	9.6	9.6	+	+	34854	32903	41621	
SM-4	Fiorucci	25	225	0	0	-	-	8	4	3	
SM-5	Fiorucci	25	225	9.6	9.6	+	+	1352	1576	1568	
SM-6	Fiorucci	25	225	9.6	9.6	+	+	32218	35723	36433	
SM-7	Daniele	25	225	0	0	-	-	6	4	4	
SM-8	Daniele	25	225	9.6	9.6	+	+	7843	7294	7660	
SM-9	Daniele	25	225	9.6	9.6	+	+	9775	9664	9885	
SM-10	Busseto	25	225	0	0	-	-	1	0	2	
SM-11	Busseto	25	225	9.6	9.6	+	+	4341	4235	4332	
SM-12	Busseto	25	225	9.6	9.6	+	+	23523	23625	23632	
SM-13	B-Head	25	225	0	0	-	-	3	4	4	
SM-14	B-Head	25	225	9.6	9.6	+	+	12340	12458	12680	
SM-15	B-Head	25	225	9.6	9.6	+	+	30038	32737	33818	

ID	Sabor de salami	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB		
						Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB analisis 1	LRB analisis 2	LRB analisis 3	
SM-16	Priv.Sel	25	225	0	0	-	-	0	3	2	
SM-17	Priv.Sel	25	225	9.6	9.6	+	+	31817	30387	32878	
SM-18	Priv.Sel	25	225	9.6	9.6	+	+	66738	63271		
SN		0	225	0	0	-	-	1	2	0	

Ejemplo 2: Evaluación por citometría de flujo de *E. coli* en espinaca, pimientos jalapeños y carne molida. Se obtuvieron la espinaca, pimientos jalapeños y carne molida de diversos mercados de víveres. La preparación de las muestras y la adquisición de datos para RAPID-B y el Método de Referencia fueron llevadas a cabo esencialmente como se delineo en el Ejemplo 1.

- 5 Los resultados de la prueba para espinaca, pimientos jalapeños y carne molida se resumen en las Tablas 7-9. Las figuras 12A y 12B presentan gráficas de emisión por citometría de flujo con salida ilustrativas obtenidas por los métodos RAPID-B para matrices de pimiento jalapeño a varios niveles de dilución. La figura 13 presente una gráfica de emisión por citometría de flujo con salida ilustrativa para una matriz de pimiento jalapeño de control negativo. Se observaron sensibilidades y ratas de falsos negativos comparables a las del Ejemplo 1. El método de referencia en
- 10 este caso produjo un falso positivo para la muestra B-7.

Tabla 7: Prueba de *E. coli* 0157 de espinaca usando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB		
					Resultado BAM final	Resultado LRB final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
S-1	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
S-2	25	225	5	5	+	+	+	691	706	758
S-3	25	225	50	50	+	+	+	1496	1780	1777
S-4	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
S-5	25	225	5	5	+	+	+	170	174	174
S-6	25	225	50	50	+	+	+	3420	4149	3279
S-7	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
S-8	25	225	5	5	+	+	+	226	215	205
S-9	25	225	50	50	+	+	+	2224	1989	2034
S-10	25	225	0	0	-	-	-	0	1	0
S-11	25	225	5	5	+	+	+	251	233	216
S-12	25	225	50	50	+	+	+	1816	1488	1489
S-13	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
S-14	25	225	5	5	+	+	+	8456	671	804
S-15	25	225	50	50	+	+	+	2219	2307	2417

ID	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB			
			Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
S-16	25	225	0	0	-	-	0	0	0
S-17	25	225	5	5	+	+	3584	4103	3790
S-18	25	225	50	50	+	+	1457	1507	1667
SN	0	225	0	0	-	-	0	0	0

Tabla 8: Prueba de *E. coli* 0157 de pimientos jalapeños utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado o LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB		
					Resultado BAM final	Resultado LRB final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
P-1	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
P-2	25	225	20	25	+	+	+	113	107	129
P-3	25	225	200	250	+	+	+	395	475	371
P-4	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
P-5	25	225	20	25	+	+	+	235	319	355
P-6	25	225	200	250	+	+	+	431	463	437
P-7	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
P-8	25	225	20	25	+	+	+	266	298	299
P-9	25	225	200	250	+	+	+	398	435	456
P-10	25	225	0	0	-	-	-	1	0	0
P-11	25	225	20	25	+	+	+	100	150	107
P-12	25	225	200	250	+	+	+	611	624	650
P-13	25	225	0	0	-	-	-	0	0	0
P-14	25	225	20	25	+	+	+	50	44	36

ID	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado o LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo		Recuento celular LRB		
					Resultado BAM final	Resultado LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
P-15	25	225	200	250	+	+	365	379	320
P-16	25	225	0	0	-	-	0	0	0
P-17	25	225	20	25	+	+	103	102	93
P-18	25	225	200	250	+	+	446	605	573
SN	0	225	0	0	-	-	0	0	0

Tabla 9: Prueba de *E. coli* 0157 de carne molida utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Peso (g)	Volumen caldo (ml)	Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado cualitativo		Recuento celular LRB		
					Resultado o BAM final	Resultado o LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
B-1	25	225	0	0	-	-	0	0	0
B-2	25	225	10	10	+	+	130	172	127
B-3	25	225	100	100	+	+	1164	1192	972
B-4	25	225	0	0	-	-	0	0	00
B-5	25	225	10	10	+	+	101	100	99
B-6	25	225	100	100	+	+	1178	1158	1228
B-7	25	225	0	0	-	-	0	0	0
B-8	25	225	10	10	+	+	754	699	749
B-9	25	225	100	100	+	+	3269	3463	3776
B-10	25	225	0	0	-	-	1	0	0
B-11	25	225	10	10	+	+	980	947	941
B-12	25	225	100	100	+	+	4578	4612	4710
B-13	25	225	0	0	-	-	1	1	0
B-14	25	225	10	10	+	+	1066	10894	1128
B-15	25	225	100	100	+	+	843	857	802

ID	Peso (g)	Volumen caído (ml)	Resultado cualitativo			Recuento celular LRB			
			Inóculo aproximado BAM Muestras (cfu)	Inóculo aproximado LRB Muestras (cfu)	Resultado o BAM final	Resultado o LRB final	LRB análisis 1	LRB análisis 2	LRB análisis 3
B-16	25	225	0	0	-	-	1	1	1
B-17	25	225	10	10	+	+	148	144	165
B-18	25	225	100	100	+	+	884	933	899
SN	0	225	0	0	-	-	0	0	0

5 Ejemplo 3: Evaluación por citometría de flujo de *Salmonella* en mantequilla de cacahuete, pimientos jalapeños y
tomates. Se obtuvieron la mantequilla de cacahuete, los pimientos jalapeños y los tomates de un proveedor local. La
proporción especificada de 9:1 del BAM de medio de crecimiento a muestra fue observada en toda la prueba. Los
tomates y los pimientos fueron picados groseramente antes de la prueba. La mantequilla de cacahuete no requirió
de preparación. En cada caso, el volumen de muestra fue pesado y colocado en una bolsa de filtro Whirlpak®. Todas
10 las muestras fueron inoculadas (*in situ*) con niveles conocidos de bacterias de *Salmonella* y se dejaron asentar sin la
adición de caldo de enriquecimiento durante una hora. El caldo de enriquecimiento (90 mL) fue agregado a cada
bolsa de muestra. Todas las muestras fueron digeridas entonces durante 5 minutos y colocadas en una incubadora
a 37°C para su crecimiento. Solamente se prepararon muestras en caldo de enriquecimiento con un volumen de
muestra de 90 mL en bolsas de filtro Whirlpak y se inocularon directamente con bacterias a niveles de concentración
conocidos sin digestión.

15 Todas las muestras fueron preparadas y colocadas en la misma incubadora al cabo de 30 minutos de la preparación
al mismo tiempo. Después del crecimiento, se recolectó una alícuota de 2 mL de muestra de cada bolsa Whirlpak y
luego se filtró a través de un filtro de 5 µm y se diluyó 4-LOGs. La muestra fue dividida, siendo utilizada una porción
con la adición de sondas fluorescentes para RAPID-B y la otra usada para inocular directamente placas de superficie
prepreparadas. Las placas de superficie prepreparadas fueron utilizadas de tal forma que todas las placas fueron
20 inoculadas al cabo de 10 minutos del análisis con RAPID-B. De la misma forma, se utilizó un volumen en placa de
100 µL para maximizar la separación de organismos sobre la placa, minimizando el potencial de subrecuento de
colonias postincubación. Los análisis por citometría de flujo fueron logrados sustancialmente similares a los del
Ejemplo 1, excepto que el citómetro de flujo había sido calibrado previamente con un protocolo de salida para
Salmonella.

25 Los resultados de las pruebas para mantequilla de cacahuete, pimientos jalapeños y tomates se resumen en las
Tablas 10-12. Se observaron sensibilidades y tasas de falsos negativos comparables al Ejemplo 1. Los resultados
para pimientos jalapeños presentados en la Tabla 11 demuestran que los dos citómetros de flujo que habían sido
estandarizados uno contra otro proveen recuentos celulares que son consistentes uno con otro entre instrumentos.
La muestra TM14 produjo un resultado positivo marginal a la vez que se esperaba un resultado negativo.

Tabla 10: *Salmonella*. Prueba de *Salmonella* en mantequilla de maní utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

Muestra ID	Peso mantequilla cacahuete (g)	Volumen caldo (ml)	Número aproximado de bacterias agregadas	Dilución	Recuento celular LRB			Resultado placa
					Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	
Neg		90	0		1	2	3	-
PB01	10	90	1800	10 ⁻⁴	4014	4580	4767	+
PB02	10	90	18	10 ⁻⁴	1394	1420	1412	+
PB03	10	90	18	10 ⁻⁴	1423	1434	1449	+
PB04	10	90	1800	10 ⁻⁴	4474	4651	4494	-
PB05	10	90	0	10 ⁻⁴	6	1	1	-
PB06	10	90	0	10 ⁻⁴	0	1	2	-
PB07	10	90	0	10 ⁻⁴	0	0	1	-
PB08	10	90	18	10 ⁻⁴	2827	2930	3014	+
PB09	10	90	18	10 ⁻⁴	2811	2888	2907	+
PB010	10	90	1800	10 ⁻⁴	4730	4688	4699	+
PB011	10	90	18	10 ⁻⁴	6442	6471	6436	+
PB012	10	90	0	10 ⁻⁴	0	0	8	-
PB013	10	90	0	10 ⁻⁴	1	2	2	-
PB014	10	90	1800	10 ⁻⁴	7921	8209	8002	+
PB015	10	90	18	10 ⁻⁴	2878	2874	2930	+

Tabla 11: Prueba de *Salmonella* en pimientos jalapeños utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Jalapeño peso (g)	Volumen caldo (ml)	Número aproximado de bacterias agregadas	Dilución	Recuento celular LRB Instrumento # 1			Recuento celular LRB Instrumento # 2		
					Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3
Neg		90	n	10 ⁻⁴	0	0	0	8	4	1
JP01	10	90	0	10 ⁻⁴	5	3	2	3	1	2
JP02	10	90	0	10 ⁻⁴	1	3	3	2	2	2
JP03	10	90	800	10 ⁻⁴	2250	2230	2243	2222	2275	2268
JP04	10	90	8	10 ⁻⁴	194	196	207	189	190	195
JP05	10	90	800	10 ⁻⁴	922	986	1020	915	1086	947
JP06	10	90	8	10 ⁻⁴	11	18	41	6	9	21
JP07	10	90	800	10 ⁻⁴	300	311	334	311	335	379
JP08	10	90	8	10 ⁻⁴	23	30	30	27	17	22
JP09	10	90	0	10 ⁻⁴	4	9	8	6	7	9
JP10	10	90	800	10 ⁻⁴	2255	2355	2593	2297	2231	2261
JP11	10	90	800	10 ⁻⁴	2181	2298	2573	2268	2184	2341
JP12	10	90	8	10 ⁻⁴	335	471	536	295	324	382
JP13	10	90	0	10 ⁻⁴	3	8	7	1	6	9
JP14	10	90	8	10 ⁻⁴	626	651	761	563	688	654

ID	Jalapeño peso (g)	Volumen caldo (ml)	Número aproximado de bacterias agregadas	Dilución	Recuento celular LRB Instrumento # 1			Recuento celular LRB Instrumento # 2		
					Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3
JP15	10	90	0	10 ⁻⁴	5	5	5	5	5	3
Neg		90	n	10 ⁻²	4	2				
JP01	10	90	0	10 ⁻²	133	93				
JP02	10	90	0	10 ⁻²	89	105				
JP06	10	90	8	10 ⁻²	1573	1611				
JP08	10	90	0	10 ⁻²	8493	8435				
JP09	10	90	0	10 ⁻²	101	59				
JP13	10	90	0	10 ⁻²	41	103				
JP14	10	90	8	10 ⁻²	97557					
JP15	10	90	0	10 ⁻²	79	82				

Tabla 12: Prueba de *Salmonella* en tomates utilizando métodos de citometría de flujo RAPID-B

ID	Peso tomates (g)	Volumen caldo (ml)	Número aproximado de bacterias agregadas	Dilución	Recuento celular LRB			Resultado placa
					Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	
Reactivo					3	1	1	
Neg		90	0	10 ⁻⁴	10	0	6	-
TM01	10	90	0	10 ⁻⁴	2	1	3	-
TM02	10	90	0	10 ⁻⁴	3	1	2	-
TM03	10	90	500	10 ⁻⁴	1	3	1	-
TM04	10	90	5	10 ⁻⁴	59	50	73	+
TM05	10	90	500	10 ⁻⁴	2718	2672	2734	+
TM06	10	90	5	10 ⁻⁴	68	67	85	+
TM07	10	90	500	10 ⁻⁴	2077	2470	2537	+
TM08	10	90	5	10 ⁻⁴	94	99	82	+
TM09	10	90	0	10 ⁻⁴	5	4	8	-
TM10	10	90	500	10 ⁻⁴	557	568	586	+
TM11	10	90	500	10 ⁻⁴	2235	2218	2245	+
TM12	10	90	5	10 ⁻⁴	40	30	30	+
TM13	10	90	0	10 ⁻⁴	7	5	9	-
TM14	10	90	5	10 ⁻⁴	10	13	8	-

ID	Peso tomates (g)	Volumen caldo (ml)	Número aproximado de bacterias agregadas	Dilución	Recuento celular LRB			Resultado placa
					Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	
TM15	10	90	0	10 ⁻⁴	0	2	1	-
NEG				10 ⁻³	2	1	1	
TM04	10	90	5	10 ⁻³	738			
TM06	10	90	5	10 ⁻³	689			
TM08	10	90	5	10 ⁻³	919			
TM12	10	90	5	10 ⁻³	427			
TM12	10	90	5	10 ⁻³	427			

Ejemplo 4: Evaluación por citometría de flujo de *Salmonella* en pimientos jalapeños en la presencia de microorganismos no objetivo. La preparación de la muestra se logró como se delineó más arriba en el Ejemplo 3, excepto que los pimientos jalapeños fueron inoculados primero con los microorganismos, y luego se dejaron secar al aire.

- 5 El propósito de este estudio es establecer la influencia de microorganismos no objetivo sobre el ensayo del organismo objetivo *Salmonella*. Los resultados de la prueba para los pimientos jalapeños en la presencia de diversos microorganismos no objetivo (*E. coli*, *Shigella* y *Citrobacter*) se resumen en la Tabla 13. Los niveles de inoculación de *Salmonella* serotipo *Typhimurium* fueron variados entre 10¹ y 10³ CFU. Las muestras de pimientos jalapeños no fueron pretratadas para reducir la flora de fondo de origen natural. Los niveles de carga en la muestra de flora de fondo fueron establecidos con placas de agar PCA. En todos los casos, el ensayo de *Salmonella* por RAPID-B indicó correctamente la presencia de *Salmonella*. Las muestras inoculadas solamente con bacterias competitivas no produjeron resultados falsos positivos mediante el ensayo para *Salmonella* RAPID-B, incluso cuando se utilizó caldo de crecimiento selectivo. Los métodos de referencia FDA BAM también identificaron correctamente las muestras positivas en *Salmonella* (cuando se utilizó el caldo de crecimiento requerido de selenito cistina), con la excepción del Punto de Prueba 18, que fue inoculado a un nivel demasiado bajo para producir resultados.
- 10
- 15

Tabla 13: Ensayo de competición de *Salmonella* por métodos de citometría de flujo RAPID-B en la presencia de microorganismos competidores

ID	Volumen caldo (ml)	Est # de Sal (cfu)	2° Bact.	Est # de 2° bact.	Peso JP (g)	Dilución	Recuento celular LRB			Cultivo por el método de referencia estándar							
							Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	HE negro @ 10 ⁻⁶	HE negro @ 10 ⁻³	HE otro @ 10 ⁻⁶	HE otro @ 10 ⁻³	PCA @ 10 ⁻⁶	PCA @ 10 ⁻³	HE Real	HE Corr.
Neg TSB	TSB/100					10 ⁻³	0	0	2			Real	Corr.	Real	Corr.	0	0
Neg SC	SC/100					10 ⁻³	1	2	2			Real	Corr.	Real	Corr.	0	0
Lavado JP	TSB/100					10 ⁻³	15	22	25			2	2000	150	150000	TNTC	TNTC +
1	TSB/100		Citro	20		10 ⁻³	2	1	1			53	53000	0	0	TNTC	TNTC +
2	TSB/100		Shig	5		10 ⁻³	1	2	1			0	0	58	58000	54	54000
3	TSB/100		E.coli	1		10 ⁻³	0	3	1			0	0	0	0	0	0
4	TSB/100	18				10 ⁻³	67803	67675	63328			225	225000	0	0	201	201000
5	TSB/100	1800	Citro	2000		10 ⁻³	38345	32345	33334			202	202000	0	0	TNTC	TNTC +
6	SC/100	1800	Citro	2000		10 ⁻³	10230	10979	11215			20	20000	0	0	111	111000
7	TSB/100	1800	Shig	500		10 ⁻³	66077	71283	79766			126	126000	9	9000	TNTC	TNTC +
8	SC/100	1800	Shig	500		10 ⁻³	13667	13027	13482			44	44000	0	0	124	12

ID	Recuento celular LRB										Cultivo por el método de referencia estándar				
	Volumen caldo (ml)	Est # de Sal (cfu)	2° Bact.	Est # de 2° bact.	Peso JP (g)	Dilución	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	HE negro @ 10 ⁻⁶	HE negro @ 10 ⁻³	HE otro @ 10 ⁻⁶	HE otro @ 10 ⁻³	PCA @ 10 ⁻⁶	PCA @ 10 ⁻³
9	TSB/100	1800	E.coli	100		10 ⁻³	44322	43121	42692	103	103000	0	0	TNTC	TN
10	SC/100	1800	E.coli	100		10 ⁻³	11511	9511	10603	49	49000	0	0	TNTC	TN
11	SC/100	18	Citro	20		10 ⁻³	6716	6249	7443	19	19000	0	0	TNTC	TNTC +
12	SC/100	18	Shig	5		10 ⁻³	10732	7344	6632	19	19000	0	0	30	30000
13	SC/100	18	E.coli	1		10 ⁻³	5415	7639	9123	76	76000	0	0	TNTC	TNTC +
14	SC/100	18				10 ⁻³	21373	22355	22891	16	16000	0	0	TNTC	TNTC
15	SC/90	1800	Shig	500	10	10 ⁻³	54330	62491	65519	76	76000	21	21000	TNTC	TN
16	SC/90	18			10	10 ⁻³	6799	6981	4483	8	8000	50	50000	TNTC	TN
17	SC/90	1800			10	10 ⁻³	29272	35789	37292	88	88000	98	98000	TNTC	TN
18	SC/90	18	E.coli	1	10	10 ⁻³	1548	1507	1475	0	0	39	39000	151	15
19	SC/90	18	Citro	20	10	10 ⁻³	8489	8068	7738	8	8000	49	49000	97	970
20	SC/90				10	10 ⁻³	21	7	1	0	0	124	124000	TNTCC	TN
21	TSB/90				10	10 ⁻³	2	1	0	0	0	33	33000	TNCT	TN
22	SC/100		Citro	2000		10 ⁻³	3	1	0	0	0	0	0	0	0
23	SC/100		Shig	500		10 ⁻³	1	1	1	0	0	0	0	0	0

ID	Volumen caldo (ml)	Est # de Sal (cfu)	2° Bact.	Est # de 2° bact.	Peso JP (g)	Dilución	Recuento celular LRB			Cultivo por el método de referencia estándar					
							Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	HE negro @ 10 ⁻⁶	HE negro @ 10 ⁻³	HE otro @ 10 ⁻⁶	HE otro @ 10 ⁻³	PCA @ 10 ⁻⁶	PCA @ 10 ⁻³
24	SC/100		E.coli	100		10 ⁻³	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Ejemplo 5: Evaluación por citometría de flujo de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en muestras de esputo humano. Se obtuvieron cinco muestras de esputo humano del Arkansas Department of Health (ADH). Las muestras de esputo habían identificadas previamente por ADH como positivas para Mtb. El análisis por citometría de flujo fue llevado a cabo utilizando un citómetro de flujo que había sido calibrado previamente utilizando un protocolo de salida Mtb. El procesamiento de la muestra se logró por modificaciones de los métodos usados para procesar alimentos definidos más arriba. Específicamente, se diluyó el esputo, se pretrató y se mezcló con reactivos de sonda para Mtb. Como controles de ensayo, las muestras que contenían reactivos de sonda solos (esto es, sin esputo) y las muestras que contenían solo esputo (esto es, sin reactivos de sonda) también fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el nivel del ruido de fondo en el ensayo. Las figuras 14A y 14B presentan gráficas de emisión por citometría de flujo ilustrativas obtenidas por los métodos RAPID-B que muestran que los reactivos de sonda y el esputo solos no produjeron fluorescencia de fondo en la región de detección para Mtb de salida 1400. En contraste, cuando cada una de las muestras con esputo fue mezclada con los reactivos de sonda Mtb, se detectaron señales fluorescentes en la región de detección de Mtb de salida 1400. Las figuras 15A-15C presentan gráficas de emisión por citometría de flujo ilustrativas para recuentos bacterianos de Mtb obtenidos por los métodos RAPID-B a partir de muestras de esputo de pacientes con tuberculosis. Los ensayos replicados hechos con separación de un día dieron el mismo nivel de recuento celular. El ensayo fue semicuantitativo en la medición de la carga bacteriana. Con base en los resultados presentados en las figuras 15A-15C, el orden de severidad para la infección por Mtb en los sujetos fue estimada como C>B>A. Este orden de severidad de la infección fue confirmado finalmente por ADH. Las muestras de control negativo de esputo obtenido de voluntarios saludables no proveyó recuentos de Mtb en la región de detección de Mtb de salida.

A partir de la descripción anterior, una persona de experiencia normal en el arte puede establecer fácilmente las características esenciales de esta divulgación, y puede hacer diversos cambios y modificaciones para adaptar la divulgación a diversos usos y condiciones. Se entenderá que algunas de las estructuras, funciones y operaciones descritas más arriba de las realizaciones anteriormente descritas no son necesarias para poner en la práctica la presente divulgación y están incluidas en la descripción simplemente para exhaustividad de una realización o realizaciones de ejemplo. Además, se entenderá que estructuras, funciones y operaciones específicas fijadas en las patentes y publicaciones de referencia descritas más arriba pueden ponerse en práctica en conjunto con la divulgación presente, pero no son esenciales para su práctica. Las realizaciones descritas aquí más arriba pretenden ser ilustrativas solamente y no deberían considerarse como limitantes del alcance de la divulgación, el cual está definido en las reivindicaciones siguientes.

Reivindicaciones

1. Un método por citometría de flujo para detectar microbios objetivo en una muestra, comprendiendo dicho método:
 - a) tratar la muestra con al menos un oxidante y al menos un detergente;
 - b) desactivar el al menos un oxidante después de tratar la muestra;
 - 5 c) mezclar la muestra con al menos una sonda para formar una muestra etiquetada; en donde la al menos una sonda comprende al menos una etiqueta; y en donde la al menos una sonda se une a los microbios objetivo en la muestra etiquetada;
 - d) introducir la muestra etiquetada en un citómetro de flujo; y
 - 10 e) analizar la muestra etiquetada; en donde el análisis comprende excitar la al menos una etiqueta con al menos una fuente de luz en el citómetro de flujo y detectar al menos una emisión fluorescente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de mezcla ocurre después de la etapa de desactivación.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: tratar la muestra con al menos una enzima antes de la etapa de mezcla.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de mezcla tiene lugar durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 20 minutos.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra etiquetada comprende aproximadamente 3% en peso hasta aproximadamente 5% en peso del al menos un detergente.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la al menos una sonda está presente a una concentración no saturadora.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de mezcla tiene lugar en la presencia de un aditivo seleccionado del grupo consistente de albúmina de suero bovino, glicerol y combinaciones de los mismos.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la al menos una fuente de luz es seleccionada del grupo consistente de luz ultravioleta, luz violeta, luz de xenón y luz azul.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: mezclar la muestra con al menos una sonda no etiquetada, en donde la al menos una sonda no etiquetada apunta hacia al menos un componente microbiano no etiquetado de la muestra.
- 25 10. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: optimizar un rendimiento del citómetro de flujo; en donde optimizar comprende:
 - a) incrementar una sensibilidad de al menos un canal de detección del citómetro de flujo incrementando una ganancia en el al menos un canal de detección;
 - 30 b) asignar un umbral de señal para cada al menos un canal de detección;
 - c) recolectar datos en bruto del citómetro de flujo para un rango de tiempo; en donde el rango de tiempo comprende una pluralidad de intervalos; y en donde los datos en bruto comprende señales y no señales para cada al menos un canal de detección;
 - 35 y
 - d) analizar los datos en bruto de cada uno de la pluralidad de intervalos para proveer datos procesados; en donde el análisis comprende: eliminar datos en bruto de cada uno de la pluralidad de intervalos en los cuales la señal no excede el umbral de señal asignado para cada al menos un canal de detección; y seleccionar datos en bruto de cada uno de la pluralidad de subintervalos en los cuales la señal no excede el umbral de señal asignado para cada al menos un canal de detección.
 - 40

11. El método de la reivindicación 1, en donde el citómetro de flujo está estandarizado contra el rendimiento de un segundo citómetro de flujo.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un oxidante está empacado en un kit de torunda.

FIGURA 1

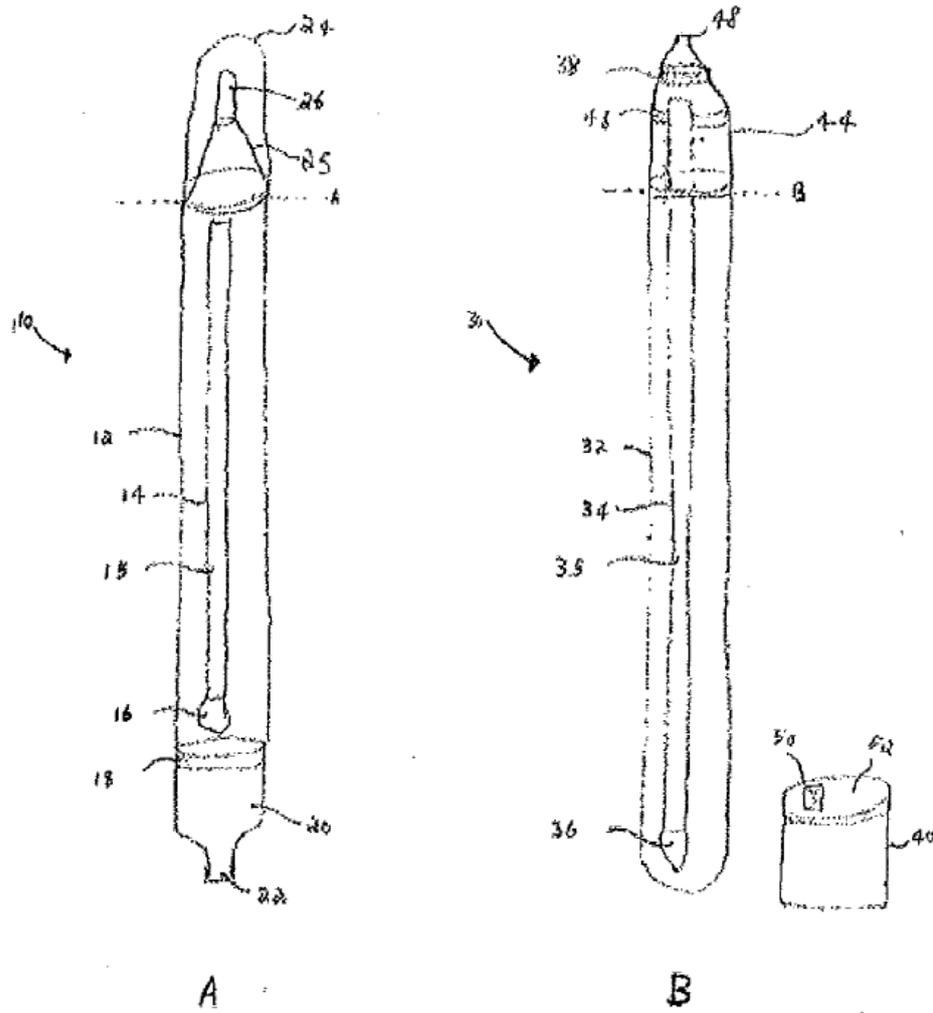


FIGURA 8

-Umbral FSC y SSC: ≥ 0.2

-Umbral FL-1, FL-2 y FL-3: ≥ 0.05

t (Tiempo)	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
1	3	0	0	0	0
2	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	3	2	1	0	0
7	0	0	0	0	0
8	1	1	1	0.5	0.5
9	0.5	0.3	0.5	0.1	0.1
10	3	3	0.1	0.1	0.1
11	0.2	1	0.1	0.1	0.1
12	0.5	0.5	0	1	1
13	0	0	0	0	0
14	3	2	1	1	1

A



t (Tiempo)	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
1	3	0	0	0	0
2	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	3	2	1	0	0
7	0	0	0	0	0
8	1	1	1	0.5	0.5
9	0.5	0.3	0.5	0.1	0.1
10	3	3	0.1	0.1	0.1
11	0.2	1	0.1	0.1	0.1
12	0.5	0.5	0	1	1
13	0	0	0	0	0
14	3	2	1	1	1

No evento ("ruido electrónico") →
 No evento ("ruido electrónico") →
 No evento (sin señal) →
 No evento (sin señal) →
 No evento (sin señal) →
 No evento ("ruido electrónico") →
 No evento (sin señal) →
 Evento (todos los parámetros por encima del umbral) →
 Evento (todos los parámetros por encima del umbral) →
 Evento (todos los parámetros por encima del umbral) →
 No evento ("ruido electrónico") →
 No evento ("ruido electrónico") →
 No evento (sin señal) →
 Evento (todos los parámetros por encima del umbral) →

B

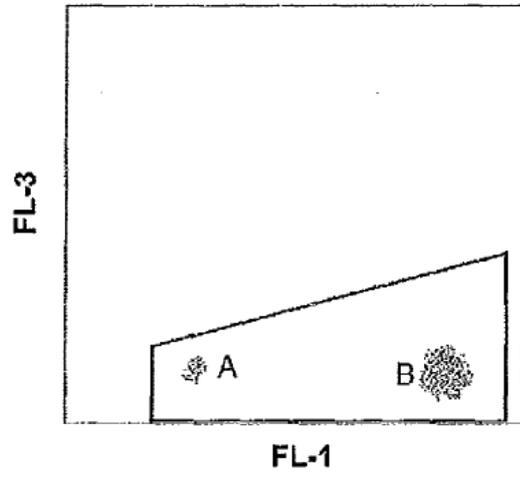


t (Tiempo)	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
1	3	0	0	0	0
2	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	3	2	1	0	0
7	0	0	0	0	0
8	1	1	1	0.5	0.5
9	0.5	0.3	0.5	0.1	0.1
10	3	3	0.1	0.1	0.1
11	0.2	1	0.1	0.1	0.1
12	0.5	0.5	0	1	1
13	0	0	0	0	0
14	3	2	1	1	1

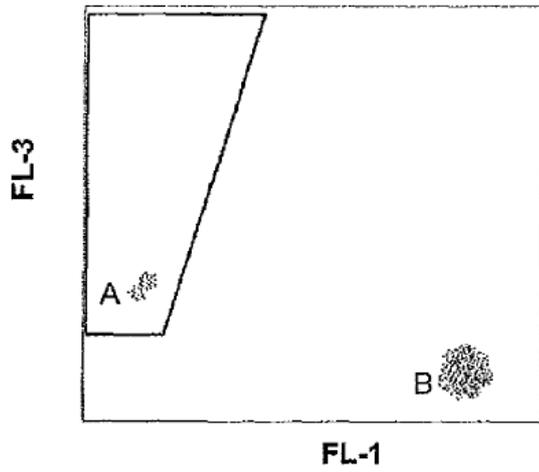
Events (all parameters above threshold)

C

FIGURA 10



A



B

FIGURAS 11A – 11C

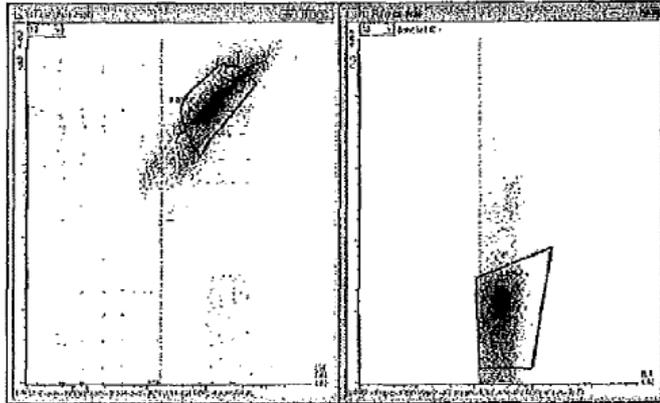


FIGURA 11A

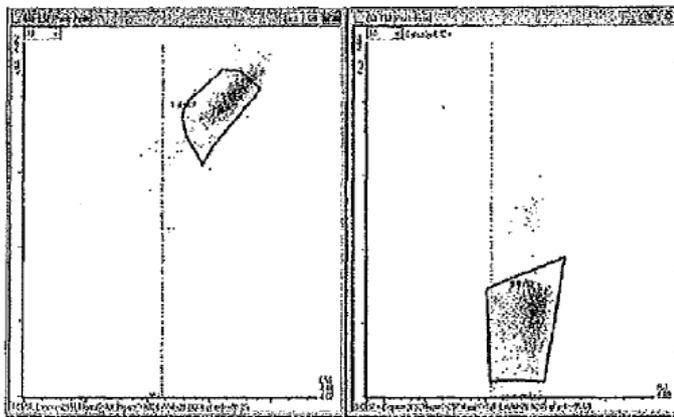


FIGURA 11B

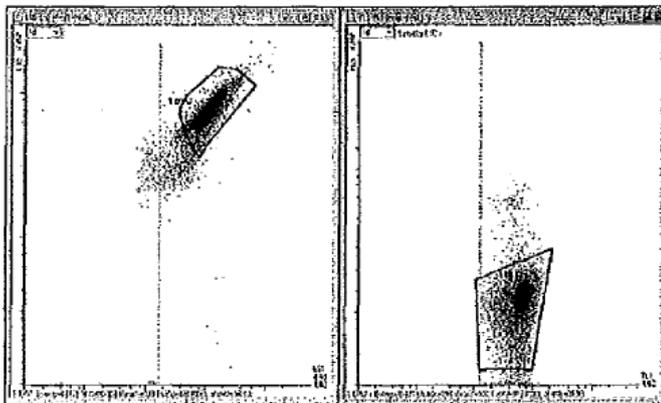


FIGURA 11C

FIGURAS 12A y 12B

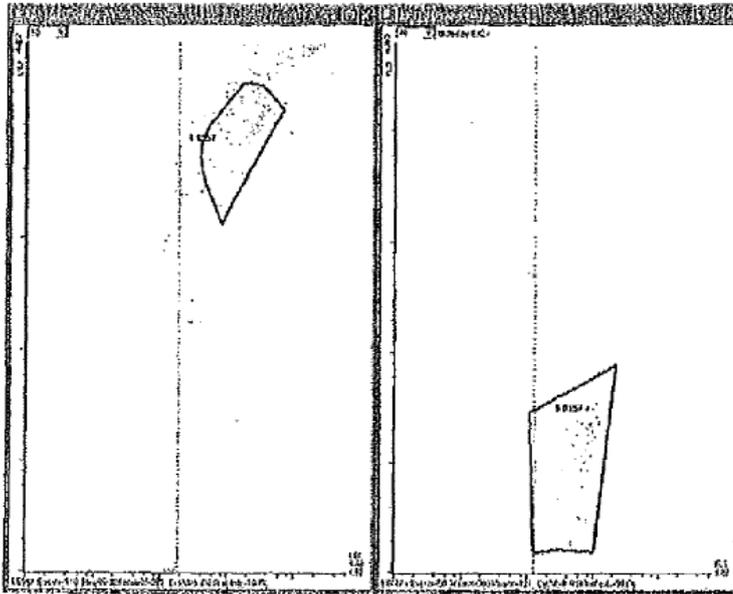


FIGURA 12A

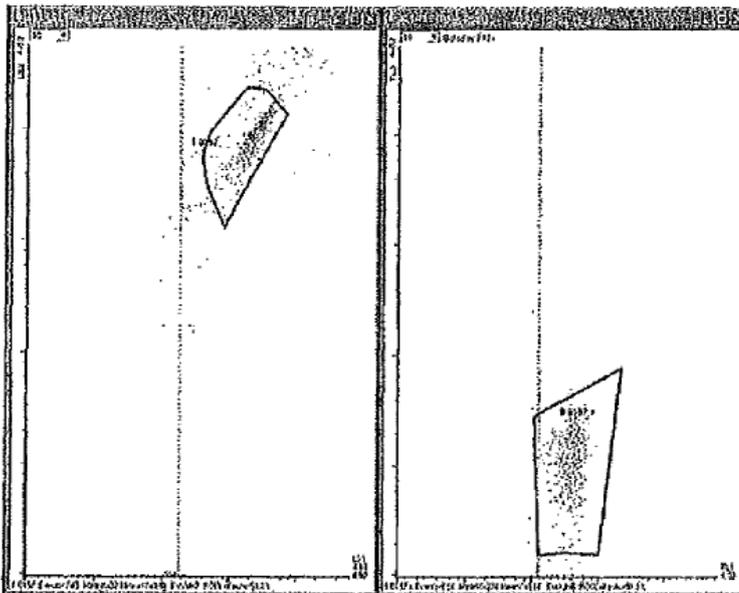
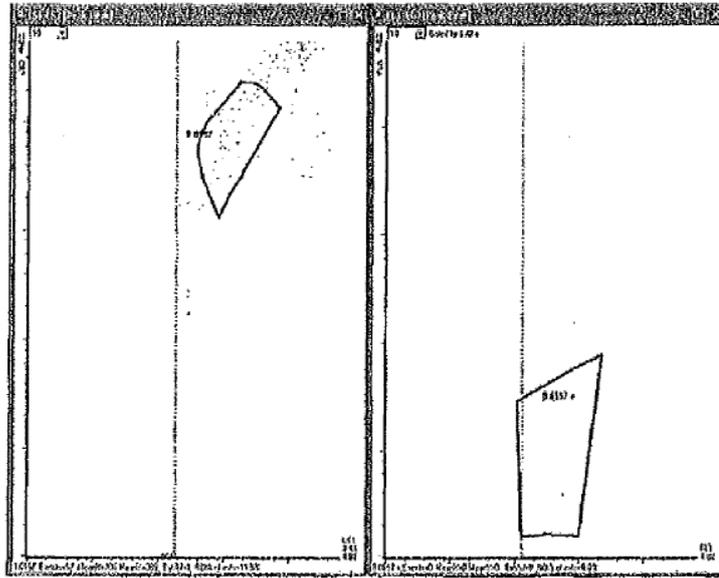


FIGURA 12B

FIGURA 13



(SALIDA TERCIARIA)

FIGURAS 14A y 14B

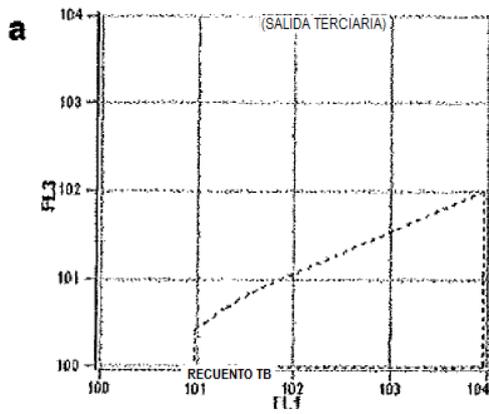


FIGURA 14A

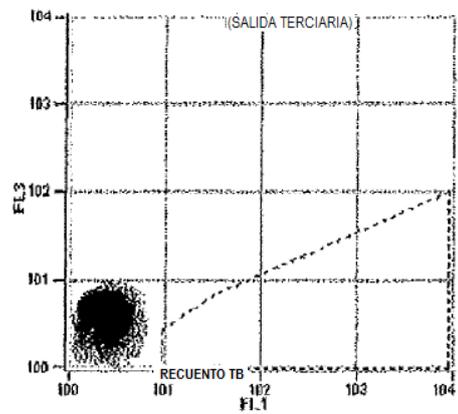


FIGURA 14B

FIGURAS 15A - 15C

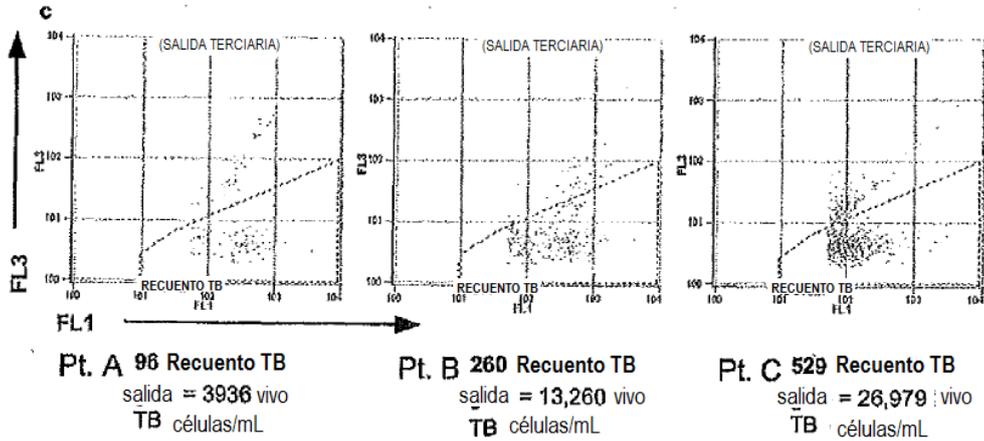


FIGURA 15A

FIGURA 15B

FIGURA 15C