

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 983**

51 Int. Cl.:

C12N 11/04 (2006.01)
C12M 1/40 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 11/06 (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
C12M 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2013** **PCT/KR2013/005947**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014** **WO14007560**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013** **E 13813820 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2873729**

54 Título: **Microestructura para la captura y liberación de microorganismos**

30 Prioridad:

06.07.2012 KR 20120073974

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2018

73 Titular/es:

QUANTA MATRIX CO., LTD (100.0%)
104dong 213-1ho SEOUL NATIONAL University
Inter University Semiconductor Research Center
1 Gwanak-ro Gwanak-gu
Seoul 151-742, KR

72 Inventor/es:

JUNG, YONG GYUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 656 983 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

Microestructuras para la captura y liberación de microorganismos

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a una microestructura para la captura y liberación de microorganismos.

5 Antecedentes de la técnica

- Para un tratamiento eficaz de un paciente que se sospecha padece septicemia o bacteremia, se practica un ensayo de cultivo de sangre para diagnosticar precisamente cuál organismo causante es responsable de la septicemia y cuál agente terapéutico es eficaz contra el organismo causante. Generalmente, se practica el ensayo de cultivo de sangre mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se recoge asépticamente sangre del paciente. Para la recogida de sangre, se usa una herramienta adecuada tal como una jeringuilla para evitar que la piel se contamine por los microbios normalmente presentes sobre la piel y los microbios presentes en entornos ambientales. Se mezclan las muestras de sangre con medios de cultivo de sangre líquidos y se observa si los microorganismos crecen durante el cultivo a 37 °C, típicamente durante 1-2 días. Se cultivan separadamente los medios inoculados con la sangre en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Como resultado, pueden cultivarse en los medios microbios anaeróbicos (incapaces de crecer en presencia de oxígeno) así como microbios aeróbicos (capaces de crecer en presencia de oxígeno) o microbios anaeróbicos facultativos (capaces de crecer con o sin oxígeno). Se recubren habitualmente los fondos de los matraces de cultivo que contienen los medios con productos químicos que tienden a decolorarse o emitir fluorescencia cuando crecen los microorganismos. Por tanto, el uso de sistemas de cultivo de sangre capaces de reconocer cambios de color o fluorescencia posibilita la detección automática del crecimiento de microorganismos en los medios. Después de extraer los microorganismos del paciente y cultivar hasta que el número de microorganismos alcanza un nivel óptimo (10^5 célula/ml), se practican los procesos posteriores (tales como la identificación de la cepa patogénica y ensayo de susceptibilidad a antibióticos). En este momento, se requiere el cultivo puro para aislar selectivamente la cepa patogénica de las soluciones de cultivo de sangre y cultivar la cepa patogénica. Según un método de cultivo puro general, se siembran las soluciones de cultivo (que contienen los microorganismos) después de cultivo de sangre sobre medios de agar para obtener la cantidad necesaria del microbio. En este momento, le lleva de aproximadamente 16 a 24 horas al microbio formar colonias. El método de cultivo puro convencional requiere un tiempo relativamente largo, que deteriora notablemente el efecto terapéutico sobre la septicemia bacteriana. Por lo tanto, se requiere un tiempo de cultivo más corto para un ensayo de susceptibilidad a antibióticos más rápido.
- El método convencional requiere también un proceso para aislar microorganismos de alimentos o entornos naturales para identificar y cultivar los microorganismos. Sin embargo, los microorganismos presentes en cantidades muy pequeñas en tales entornos no son fáciles de aislar. Incluso cuando los microorganismos están presentes en cantidades relativamente grandes, es necesario para aislar los microorganismos un proceso prolongado para cultivar los microorganismos.
- Por lo tanto, existe la necesidad de un método de aislamiento de microorganismos de diversos entornos, por ejemplo, tejidos, sangre, heces y orina derivados de organismos, alimentos y entornos naturales de manera eficaz y prolongada.

Descripción detallada de la invención

- Según un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan estructuras para la captura y liberación de microorganismos que incluyen microestructuras, cada una de las cuales tiene un área superficial donde son adheribles uno o más microorganismos, y una proteína recubierta sobre las microestructuras y capaz de adhesión/desprendimiento de los microorganismos mediante control artificial, en las que la microestructura comprende además una capa protectora que tiene grupos funcionales que facilitan el recubrimiento de lectina de unión a manosa (MBL), en las que la capa protectora es una capa recubierta con sílice en la que al menos uno de anchura, grosor y longitud de la microestructura es de 1 μ m a 1 mm, y en la que la microestructura está basada en un polímero o polímeros producidos curando un material curable.

- Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para la captura y liberación de microorganismos usando microestructuras que incluye proporcionar microestructuras recubiertas con una proteína para la adhesión/desprendimiento de microorganismos como se menciona anteriormente, mezclar las microestructuras con una solución que contiene sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos en una solución que contiene microorganismos para preparar una solución mixta, agitar la solución mixta para adherir los microorganismos a las microestructuras, separar las microestructuras con microorganismos adheridos de la solución mixta y rebajar la concentración de las sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos para desprender los microorganismos de las microestructuras.

55 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama que muestra un modelo en que las bacterias están unidas o no unidas a una lectina de

unión a manosa (MBL) humana.

La Fig. 2 muestra (a) un diagrama esquemático y (b) una imagen de microscopio óptico real que ilustran un estado en que las bacterias están adheridas a una microestructura recubierta con MBL.

5 La Fig. 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un método para la captura y aislamiento de microorganismos.

La Fig. 4 muestra imágenes de microscopio óptico que muestran los resultados de experimentos que comparan las propiedades de captura y liberación de bacterias de microestructuras recubiertas con anticuerpo y microestructuras recubiertas con MBL.

10 Las Fig. 5 a 8 muestran el número de células registradas cada hora después de aislar de las microestructuras bacterias adheridas a microestructuras recubiertas con MBL y microestructuras recubiertas con anticuerpo, seguido de cultivo.

Modo para llevar a cabo la invención

Se describirán ahora realizaciones de la presente divulgación con detalle con referencia a los dibujos acompañantes. Estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación sea exhaustiva y exprese completamente el alcance de la divulgación a los especialistas en la materia. Por consiguiente, la presente divulgación puede materializarse en muchas formas diferentes y no debería considerarse limitada a las realizaciones ejemplares expuestas en la presente memoria. En los dibujos, las dimensiones tales como anchuras, longitudes y grosores de los elementos pueden estar exageradas para claridad. Los mismos numerales de referencia designan los mismos elementos a lo largo de los dibujos. Los dibujos se explican desde el punto de vista del observador. Se entenderá que, cuando se hace referencia a un elemento como "sobre" otro elemento, puede estar directamente sobre el otro elemento o pueden estar presentes también uno o más elementos intermedios entre medias.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona estructuras novedosas para la captura o liberación de microorganismos de manera sencilla. Las estructuras de la presente divulgación incluyen microestructuras, cada una de las cuales tiene un área superficial donde son adheribles uno o más microorganismos, y una proteína recubierta sobre las microestructuras y capaz de adhesión/desprendimiento de los microorganismos por control artificial como se menciona anteriormente.

25 Las microestructuras se diseñan para ser estructuralmente adecuadas para la captura y liberación de microorganismos. El área superficial de cada microestructura es suficientemente grande para capturar uno o más microorganismos. Es decir, las dimensiones de cada microestructura son mayores que las de los microorganismos como se mencionan anteriormente.

El término "microestructura" usado en la presente memoria hace referencia a una estructura cuyas dimensiones son iguales o mayores a las de los microorganismos tales como bacterias y cuyo lado más largo es de al menos 1 μm . Cada una de las microestructuras puede ser una estructura que tiene al menos uno de su anchura, grosor y longitud en el intervalo de 1 μm a 1 mm. Al menos una de las dimensiones de anchura, grosor y longitud de la microestructura puede ser típicamente de decenas a centenas de micrómetros. La microestructura puede tener una estructura isotrópica tal como una estructura esférica, poliédrica, plana o de tipo barra. Como alternativa, la microestructura puede tener una estructura anisotrópica o puede no tener forma. Por ejemplo, la microestructura puede ser una estructura esférica que tiene un diámetro de decenas de micrómetros. Preferiblemente, la microestructura es una estructura plana o en forma de disco que tiene una anchura de decenas de micrómetros. Cuando las microestructuras son de forma plana, puede adherirse al menos un microorganismo a cada microestructura. Además, se adhieren y distribuyen una pluralidad de microorganismos a los lados frontal y trasero de las microestructuras planas. Esta distribución plana es ventajosa para centrarse en un objeto o determinar el número de microorganismos en un proceso posterior para observar los microorganismos con un sistema de imagenología.

45 Las microestructuras pueden fabricarse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, la litografía de flujo continuo divulgada en la publicación de patente de EE.UU. n° 2007/0105972 o la litografía optofluídica que usa un dispositivo de microespejo digital (DMD) divulgada en la patente coreana n° 0875900 pueden usarse para fabricar microestructuras con diversas formas, tamaños y composiciones químicas de manera más rápida y sencilla.

50 Las microestructuras pueden ser polímeros producidos curando un material curable tal como un polímero o monómero curable por UV. El material curable puede incluir un polímero hidrófilo en fase líquida capaz de formar un hidrogel.

Los ejemplos de tales materiales curables capaces de formar un hidrogel incluyen polímeros que contienen silicona tales como polidimetilsiloxano, poliácridamida, poli(óxido de etileno), diacrilato de polietilenglicol, diacrilato de polipropilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliácrlato y copolímeros de los mismos. Por ejemplo, puesto que el diacrilato de polietilenglicol (PEG-DA) como material curable tiene grupos funcionales acrilato en ambos extremos de la cadena de polietilenglicol (PEG), puede reticularse formando un hidrogel tridimensional mediante

polimerización de radicales libres. El material curable puede incluir además cualquier tipo de medio cuyo estado pueda cambiarse de líquido a sólido.

La irradiación del material curable con luz UV a través de un patrón de fotomáscara o un patrón de máscara formado en un dispositivo de microespejo digital posibilita la fabricación de microestructuras de diversas formas.

- 5 Las microestructuras están recubiertas con la proteína capaz de adhesión/desprendimiento de los microorganismos por control artificial mencionada anteriormente. La proteína hace a las microestructuras adecuadas para la captura y liberación de los microorganismos. La superficie de la proteína interacciona con los microorganismos. Las características de superficie de la proteína pueden variarse controlando artificialmente factores tales como pH, temperatura y concentración de ión metálico externo. Por ejemplo, las microestructuras pueden capturar o liberar los
- 10 microorganismos en un intervalo de pH predeterminado, un intervalo de temperatura predeterminado o un intervalo de concentración iónica predeterminado.

Cada microestructura puede incluir además una capa protectora que tiene grupos funcionales. Se usa una capa recubierta con sílice como capa protectora. La introducción de grupos funcionales tales como grupos carboxilo facilita el recubrimiento de la proteína para adhesión/desprendimiento de los microorganismos tal como MBL.

- 15 Cuando las microestructuras están basadas en un hidrogel, la capa recubierta con sílice aumenta la estabilidad de las microestructuras y previene que la MBL se absorba en el hidrogel. Pueden introducirse grupos funcionales para la introducción de MBL mediante los grupos $-OH$ de superficie de la capa recubierta con sílice.

- La proteína puede unirse a glicoproteínas o carbohidratos presentes sobre las superficies de los microorganismos. Los microorganismos pueden ser, por ejemplo, virus, bacterias y protozoos. La proteína para
- 20 adhesión/desprendimiento de los microorganismos puede ser, por ejemplo, una proteína sérica dependiente de calcio. Específicamente, la proteína sérica dependiente de calcio puede ser una lectina de unión a manosa (MBL). La lectina de unión a manosa (MBL) se denomina también proteína de unión a manosa (MBP). La MBL es una lectina dependiente del ión de calcio (Ca^{2+}) (lectina de tipo C) que activa la ruta de la lectina o funciona como opsonina para mejorar notablemente la fagocitosis de leucocitos. Las características de la proteína para
- 25 adhesión/desprendimiento de microorganismos pueden controlarse artificialmente por las sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos. Por ejemplo, la MBL puede unirse a los microorganismos por iones de calcio.

- La Fig. 1 es un diagrama que muestra un modelo en que las bacterias como microorganismos están unidas o no unidas a una lectina de unión a manosa (MBL) como proteína. Cuando están presentes iones de calcio (Ca^{2+}) a alta concentración, se une la MBL a residuos de azúcar de las paredes celulares microbianas a través de los iones de
- 30 calcio, sujetando los microbios con gran fuerza (véase (a) de la Fig. 1). Ahora bien, cuando los iones de calcio (Ca^{2+}) están presentes a baja concentración, la MBL no se une ya a las paredes celulares microbianas y, como resultado, se liberan los microbios (véase (b) de la Fig. 1).

- Haciendo referencia a la Fig. 1, la MBL tiene de 2 a 6 dominios de reconocimiento de carbohidrato (CRD). La MBL puede atrapar azúcares presentes sobre las superficies de los microorganismos tales como bacterias a través de
- 35 iones de calcio. Como resultado, las microestructuras recubiertas con MBL pueden capturar los microorganismos en un entorno donde los iones de calcio están presentes a alta concentración (p.ej., 20 mM o mayor). La MBL puede capturar ventajosamente casi todas las clases de bacterias con alta eficacia. Las bacterias pueden aislarse fácilmente de la MBL rebajando la concentración de iones de calcio ambientales. Las bacterias recogidas pueden cultivarse o usarse directamente para ensayos de susceptibilidad a antibióticos (AST).

- 40 La Fig. 2 muestra (a) un diagrama esquemático y (b) una imagen de microscopio óptico real que ilustran un estado en que las bacterias están adheridas a la microestructura recubierta con MBL. (b) de la Fig. 2 muestra un estado en que *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como especie bacteriana está adherida a un PEG en forma de disco como microestructura. La microestructura tiene un diámetro de 5 a 100 μm y una altura de 25 μm .

- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la captura y aislamiento de microorganismos usando microestructuras. La Fig. 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización del método para la captura y
- 45 aislamiento de microorganismos. Haciendo referencia a la Fig. 3, en la etapa S1, se proporcionan microestructuras recubiertas con una proteína para la adhesión/desprendimiento de microorganismos.

- En la etapa S2, se mezclan las microestructuras con una solución que contiene sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos en una solución que contiene microorganismos para preparar una solución mixta. Los
- 50 microorganismos pueden ser, por ejemplo, bacterias presentes en soluciones de cultivo generales, bacterias cultivadas después de cultivo de sangre o bacterias presentes en diversos entornos, por ejemplo sangre, heces, orina o tejidos derivados de organismos, alimentos o entornos naturales. En el caso en que las microestructuras estén recubiertas con MBL, la solución que contiene sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos puede ser, por ejemplo, una solución tampón para células, tal como TE o solución salina tamponada con fosfato que
- 55 contiene iones de calcio.

En la etapa S3, se agita la solución mixta para adherir los microorganismos a las microestructuras. Por ejemplo, la solución mixta puede agitarse apropiadamente centrifugando a 50 a 100 rpm a 30 a 37 °C.

En la etapa S4, se separan las microestructuras con microorganismos adheridos de la solución mixta. Puede usarse filtración para separar las microestructuras. Como alternativa, puede usarse separación magnética cuando las microestructuras incluyen un material magnético.

En la etapa S5, se exponen las microestructuras a un entorno donde las sustancias que ayudan a la adhesión de los microorganismos están presentes a baja concentración. Debido a esta exposición, los microorganismos pueden desprenderse de las microestructuras. Las microestructuras con microorganismos adheridos pueden exponerse a una solución donde se excluyen las sustancias que ayudan a la adhesión de los microorganismos y, como resultado, pueden aislarse los microorganismos de las microestructuras. Por ejemplo, la solución que contiene las microestructuras de MBL adheridas a los microorganismos debido a la presencia de iones de calcio puede tratarse con TE o PBS libres de iones de calcio para retirar el calcio de los mismos, y ponerse entonces las microestructuras en un medio de microorganismos ordinario. Puesto que la MBL se une a las superficies de los microorganismos a través de iones de calcio, la exposición de las microestructuras con microorganismos adheridos al entorno líquido donde los iones de calcio están presentes a baja concentración (p.ej., 1 mM o menos) posibilita el aislamiento de los iones de calcio de la MBL, facilitando el desprendimiento de los microorganismos de las microestructuras. Los microorganismos desprendidos permanecen sustancialmente intactos y por tanto pueden cultivarse eficazmente en un medio en una etapa posterior.

Como se describe anteriormente, el uso de microestructuras recubiertas con MBL posibilita la captura de clases desconocidas de bacterias presentes a bajas concentraciones. Después de ello, las bacterias capturadas pueden aislarse fácilmente de las microestructuras en un medio, dando como resultado un aumento de la eficacia de cultivo de las bacterias. Por lo tanto, el método de la presente divulgación puede usarse en las siguientes aplicaciones.

En primer lugar, la presente divulgación puede aplicarse a un sistema de ensayo de susceptibilidad a antibióticos de bacterias. La alta tasa de captura y eficacia de cultivo del método según la presente divulgación pueden acortar significativamente el tiempo requerido para un cultivo puro (normalmente 16-24 horas). Por ejemplo, según la presente divulgación, puede cultivarse sangre que contiene bacterias a una concentración de 10^5 ufc/ml a una mayor concentración de 10^7 ufc/ml al cabo de aproximadamente 3 horas.

En segundo lugar, la presente divulgación puede usarse para aislar eficazmente microorganismos (p.ej., bacterias o virus) presentes en diversos entornos, por ejemplo tejidos, sangre, heces u orina derivados de organismos, alimentos o entornos naturales. Como resultado, el tiempo requerido para identificar los microorganismos puede reducirse. Si es necesario, la presente divulgación puede usarse también para cultivar eficazmente los microorganismos.

En tercer lugar, la presente divulgación puede usarse para el almacenamiento de bacterias. CRYOBANK™, un sistema comercial para el almacenamiento y conservación de cepas bacterianas, usa perlas de cerámica cuya capacidad de adsorber bacterias es baja, haciendo difícil almacenar una serie de bacterias en las mismas. Por consiguiente, se espera que la presente divulgación sea más ventajosa en términos de captura de bacterias y eficacia de cultivo en comparación con el sistema de perlas convencional.

En cuarto lugar, la presente divulgación puede usarse también en aplicaciones en que las bacterias se capturan y las células bacterianas capturadas se someten a lisis usando perlas para aislar eficazmente ADN y proteínas, como un kit de captura de bacterias de Hyglos. Puesto que el kit de lisis de perlas comercial convencional usa anticuerpos para capturar bacterias, puede aplicarse a cepas particulares y no puede aplicarse a un amplio intervalo de cepas. En contraposición, la presente divulgación puede usarse para capturar fácilmente diversas clases de cepas.

Las ventajas de la presente invención se distinguen de la técnica anterior. Según la técnica anterior, los métodos para la recogida de bacterias se dividen ampliamente en dos grupos. Uno está asociado a la adhesión de anticuerpos bacterianos a perlas (Sánchez, J. & Jonson, G. "Binding of bacteria to carbohydrates immobilized on beads to demonstrate the presence of cell-associated hemagglutinins in *Vibrio cholerae*". *APMIS* 98: 353-357, 1990), y el otro está asociado al recubrimiento de MBL sobre nanopérlas (Keun-Hwa Park, Kenji Kurokawa, "Human Serum Mannose-binding Lectin Senses Wall Teichoic Acid Glycopolymer of *Staphylococcus aureus*, Which is Restricted in Infancy" VOLUMEN 285/NÚMERO 35/27 DE AGOSTO DE 2010). En el primer método, se une una clase de bacterias con alta especificidad a una clase particular de anticuerpo. Sin embargo, el uso de anticuerpos no asegura la captura de diversas bacterias o bacterias desconocidas con alta eficacia. Según el segundo método, se adhieren perlas a escala nanométrica a bacterias a escala micrométrica para capturar las bacterias. Este método asegura la captura de las bacterias con alta eficacia, pero tiene dificultades para desprender las perlas de las bacterias. Además, las perlas de tamaño nanométrico pueden ser tóxicas para las células, afectando al crecimiento de las bacterias. Como consecuencia, este método es difícil de aplicar al cultivo de las bacterias capturadas o al uso en otras aplicaciones tales como AST. Es decir, el uso de nanopérlas es útil en la determinación de la presencia de bacterias, pero hace al método difícil de usar con fines distintos de la recogida e identificación de bacterias.

La presente divulgación se explicará con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

[EJEMPLOS]

Fabricación de microestructuras

Se curó PEG-DA por litografía sin máscara optofluídica (OFML) produciendo perlas en forma de disco con diversos diámetros de 50-200 μm y grosores de aproximadamente 10-50 μm , principalmente un diámetro de 100 μm y un grosor de 25 μm . Se permitió incluir en las perlas en forma de disco un material magnético en una cantidad tal que la relación en volumen de PEG-DA a material magnética fuera de 10:1. Debido a la presencia del material magnético, se separaron fácilmente las perlas de una solución mixta en el proceso posterior. Se recubrió sílice sobre las superficies de las perlas. Después de ello, se adhirieron anticuerpos o MBL a las superficies de las perlas usando un catalizador tal como ECD/NHS. Se añadieron los anticuerpos o MBL en una cantidad tal que la concentración alcanzara aproximadamente 1-125 $\mu\text{g/ml}$ (típicamente 5 $\mu\text{g/ml}$).

Comparación de las propiedades de captura y liberación de bacterias de las microestructuras recubiertas con MBL y las microestructuras recubiertas con anticuerpo

Se compararon las propiedades de captura y liberación de microestructuras recubiertas con MBL con aquellas de las microestructuras recubiertas con anticuerpo de acuerdo con el siguiente procedimiento experimental.

En primer lugar, se cultivó sangre infectada con bacterias hasta que el número de células alcanzó un máximo de $10^8/\text{ml}$. Se prepararon muestras que tenían concentraciones de 10^0 - 10^7 cuentas/ml. Se recubrieron las microestructuras con anticuerpos específicos de bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas. Separadamente, se recubrieron las microestructuras con MBL. Se centrifugaron las microestructuras a 50-100 rpm en las soluciones de cultivo bacteriano (cada una 1 ml) a 37 °C durante 1 h. Se ajustó el número de microestructuras en cada solución de cultivo bacteriano a 5000 cuentas. Como resultado de la centrifugación, se adhirieron las bacterias a las microestructuras.

Después de la terminación del cultivo, se usó un método magnético o de filtración para aislar las perlas con bacterias adheridas. Después de ello, se transfirieron las perlas a soluciones de cultivo recientes. Se dejaron desprender naturalmente las bacterias de las estructuras. Se cultivaron las bacterias puras aisladas de las microestructuras durante 1-4 horas. Se midieron los números de bacterias cultivadas liberadas de las microestructuras recubiertas con anticuerpo y de las estructuras recubiertas con MBL y se compararon cada hora (C-chip, NanoEntek).

La Fig. 4 muestra imágenes de microscopio óptico que muestran los resultados de experimentos que comparan las propiedades de captura y liberación de bacterias de las microestructuras recubiertas con anticuerpo y las microestructuras recubiertas con MBL. En las imágenes superiores de la Fig. 4, se comparó la capacidad de adhesión de las microestructuras con MBL (izquierda) con la de las microestructuras con anticuerpo (derecha). En las imágenes inferiores, se comparó la capacidad de los microorganismos de desprenderse de las microestructuras con MBL (izquierda) con la de las microestructuras con anticuerpo (derecha).

Haciendo referencia a la Fig. 4, se adhirieron mayores cantidades de las dos clases diferentes de bacterias (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) a las microestructuras con MBL que a las microestructuras con anticuerpo. Las imágenes inferiores muestran que las bacterias adheridas se desprendían de modo mucho más eficaz de las microestructuras con MBL que de las microestructuras con anticuerpo convencionales. Las bacterias aisladas de las microestructuras con MBL pueden también reutilizarse. Por consiguiente, podía confirmarse que las microestructuras recubiertas con MBL a las que se adherían todos los grupos de bacterias mostraban una eficacia de reacción mucho mayor que las microestructuras a las que se adherían bacterias basándose en reacciones específicas con los anticuerpos. Estos resultados sugieren que pueden aislarse números mayores de bacterias puras de las microestructuras recubiertas con MBL en un tiempo corto en ensayos de susceptibilidad a antibióticos posteriores, demostrando que el método de la presente divulgación es ventajoso en términos de tiempo, coste y sensibilidad frente a los métodos de aislamiento y cultivo puros convencionales.

Las Fig. 5 a 8 muestran el número de células registradas cada hora después de aislar de las microestructuras cuatro clases de bacterias adheridas a las microestructuras recubiertas con MBL y a las microestructuras recubiertas con anticuerpo, seguido de cultivo. Las bacterias eran *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Fig. 5), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Fig. 6), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Fig. 7) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Fig. 8).

En cada figura, (a) muestra los números de células bacterianas derivadas de microestructuras recubiertas con MBL y (b) muestra los números de células bacterianas derivadas de microestructuras recubiertas con anticuerpo.

Haciendo referencia a las Fig. 5 a 8, las bacterias aisladas de las microestructuras con MBL crecían más rápidamente que las bacterias aisladas de las microestructuras con anticuerpo. Los números en las figuras indican el número de bacterias por ml. Cuando el número de bacterias alcanzaba 10^7 o más, como se indica por números rojos, puede practicarse el ensayo de susceptibilidad a antibióticos.

Los resultados de las Fig. 5 a 8 revelan que las actividades de las bacterias adheridas a y desprendidas de las microestructuras con MBL eran mayores que aquellas de las bacterias adheridas a y desprendidas de las

microestructuras con anticuerpo.

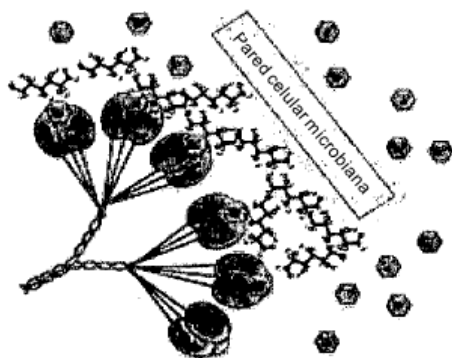
Aunque la presente divulgación se ha descrito con detalle con referencia a las realizaciones anteriores, los especialistas en la materia apreciarán que pueden hacerse diversas variaciones y modificaciones a las realizaciones sin apartarse del alcance de la presente divulgación como se divulga en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

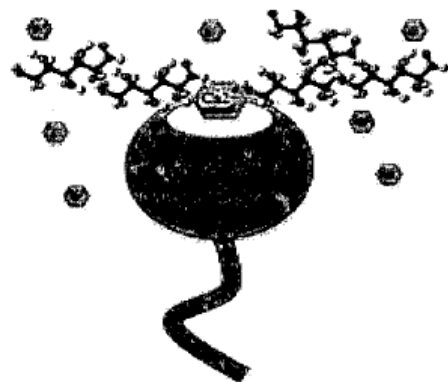
1. Una estructura para la captura y liberación de microorganismos que comprende:
una microestructura que tiene un área superficial que es suficientemente grande para capturar uno o más microorganismos; y
- 5 una lectina de unión a manosa (MBL) recubierta sobre la microestructura y capaz de adhesión/desprendimiento de los microorganismos por control artificial,
en la que la microestructura comprende además una capa protectora que tiene grupos funcionales que facilitan el recubrimiento de la lectina de unión a manosa (MBL), en la que la capa protectora es una capa recubierta con sílice, en la que al menos uno de anchura, grosor y longitud de la microestructura es de 1 μm a 1 mm, y en la que la
10 microestructura está basada en un polímero o polímeros producidos curando un material curable.
2. La estructura según la reivindicación 1, en la que la microestructura está basada en un hidrogel.
3. La estructura según la reivindicación 1, en la que el material curable se selecciona de polidimetilsiloxano, poliacrilamida, poli(óxido de etileno), diacrilato de polietilenglicol, diacrilato de polipropilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliacrilato y copolímeros de los mismos.
- 15 4. La estructura según la reivindicación 1, en la que la microestructura es una estructura plana o en forma de disco.
5. La estructura según la reivindicación 1, en la que la microestructura comprende además un material magnético.
6. Un método para la captura y liberación de microorganismos usado microestructuras que comprende:
20 proporcionar microestructuras recubiertas con una proteína para la adhesión/desprendimiento de microorganismos;
mezclar las microestructuras con una solución que contiene sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos en una solución que contiene microorganismos para preparar una solución mixta;
agitar la solución mixta para adherir los microorganismos a las microestructuras;
separar las microestructuras con microorganismos adheridos de la solución mixta; y
- 25 exponer las microestructuras a un entorno donde las sustancias que ayudan a la adhesión de microorganismos están presentes a una baja concentración para desprender los microorganismos de las microestructuras,
en el que la microestructura comprende además una capa protectora que tiene grupos funcionales que facilitan el recubrimiento de la proteína, y en el que la proteína es una lectina de unión a manosa (MBL) y las sustancias que ayudan a la adhesión/desprendimiento de microorganismos son iones de calcio, en el que la capa protectora es una
30 capa recubierta de sílice, en el que al menos uno de anchura, grosor y longitud de la microestructura es de 1 μm a 1 mm y en el que la microestructura está basada en un polímero o polímeros producidos curando un material curable.
7. El método según la reivindicación 6, en el que los microorganismos se adhieren a las microestructuras en presencia de iones de calcio a una concentración de 20 mM o mayor.
8. El método según la reivindicación 6, en el que los microorganismos se desprenden de las microestructuras
35 en presencia de iones de calcio a una concentración de 1 mM o menos.
9. Uso de una estructura para la captura y liberación de microorganismos, en el que dicha estructura comprende
una microestructura que tiene un área superficial que es suficientemente grande para capturar uno o más microorganismos; y
- 40 una lectina de unión a manosa (MBL) recubierta sobre la microestructura, en el que la microestructura comprende además una capa protectora que tiene grupos funcionales que facilitan el recubrimiento de la lectina de unión a manosa (MBL), en el que la capa protectora es una capa recubierta con sílice, en el que al menos uno de anchura, grosor y longitud de la microestructura es de 1 μm a 1 mm, y en el que la microestructura está basada en un polímero o polímeros producidos curando un material curable.
- 45 10. Uso de una estructura según la reivindicación 9, en la que la estructura se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig. 1

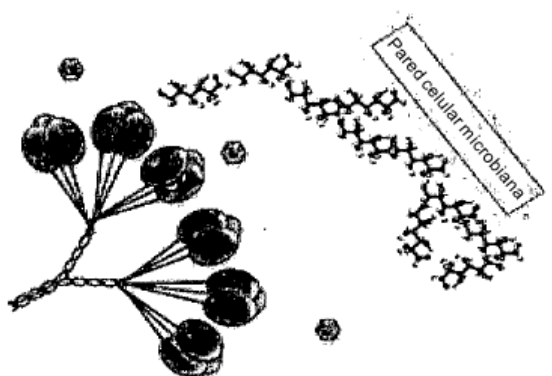
(a)



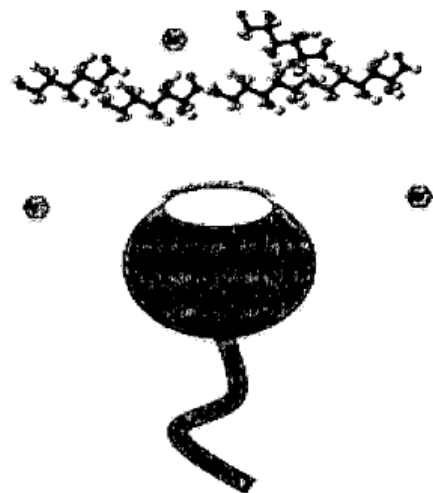
Pared celular microbiana



(b)



Pared celular microbiana

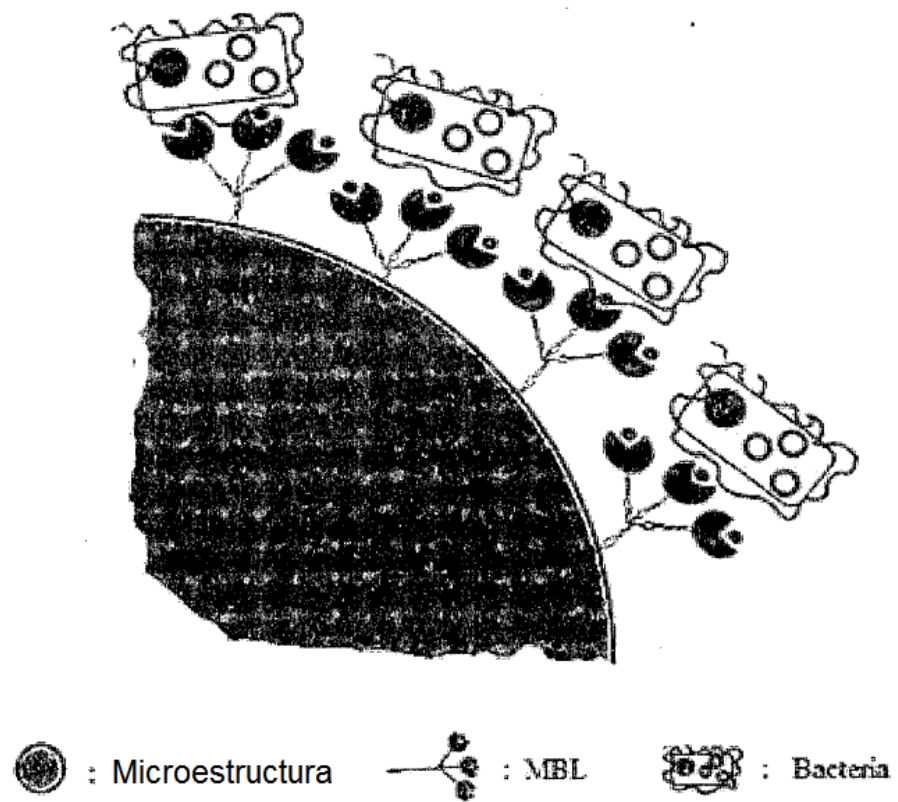


Multímero de MBL



CRD individual

Fig. 2 (a)



(b)

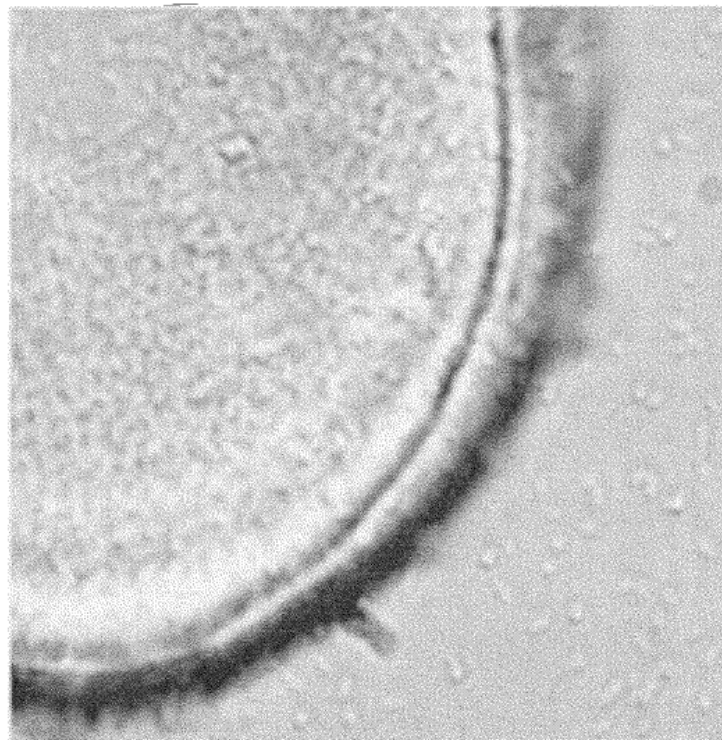


Fig. 3

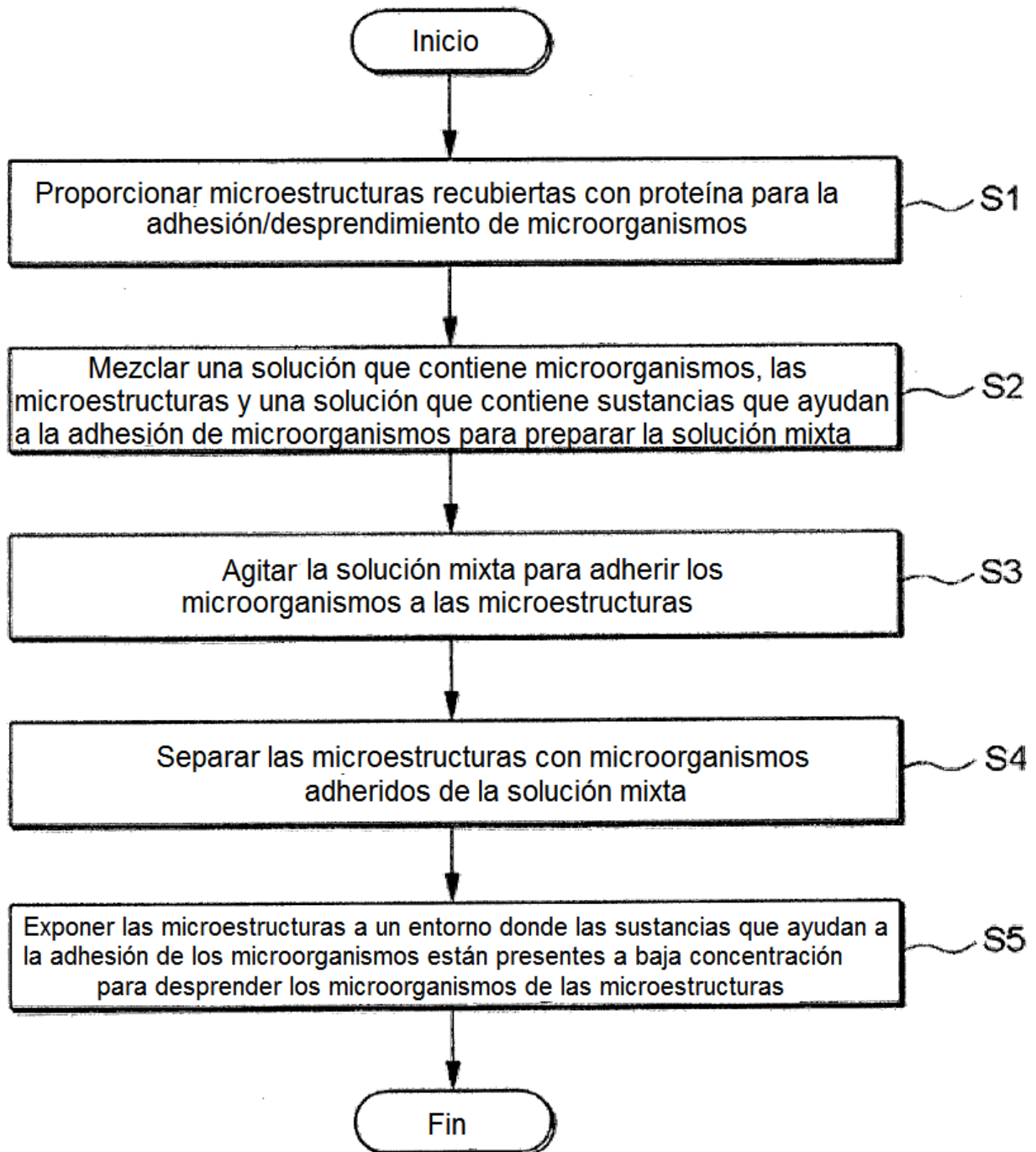
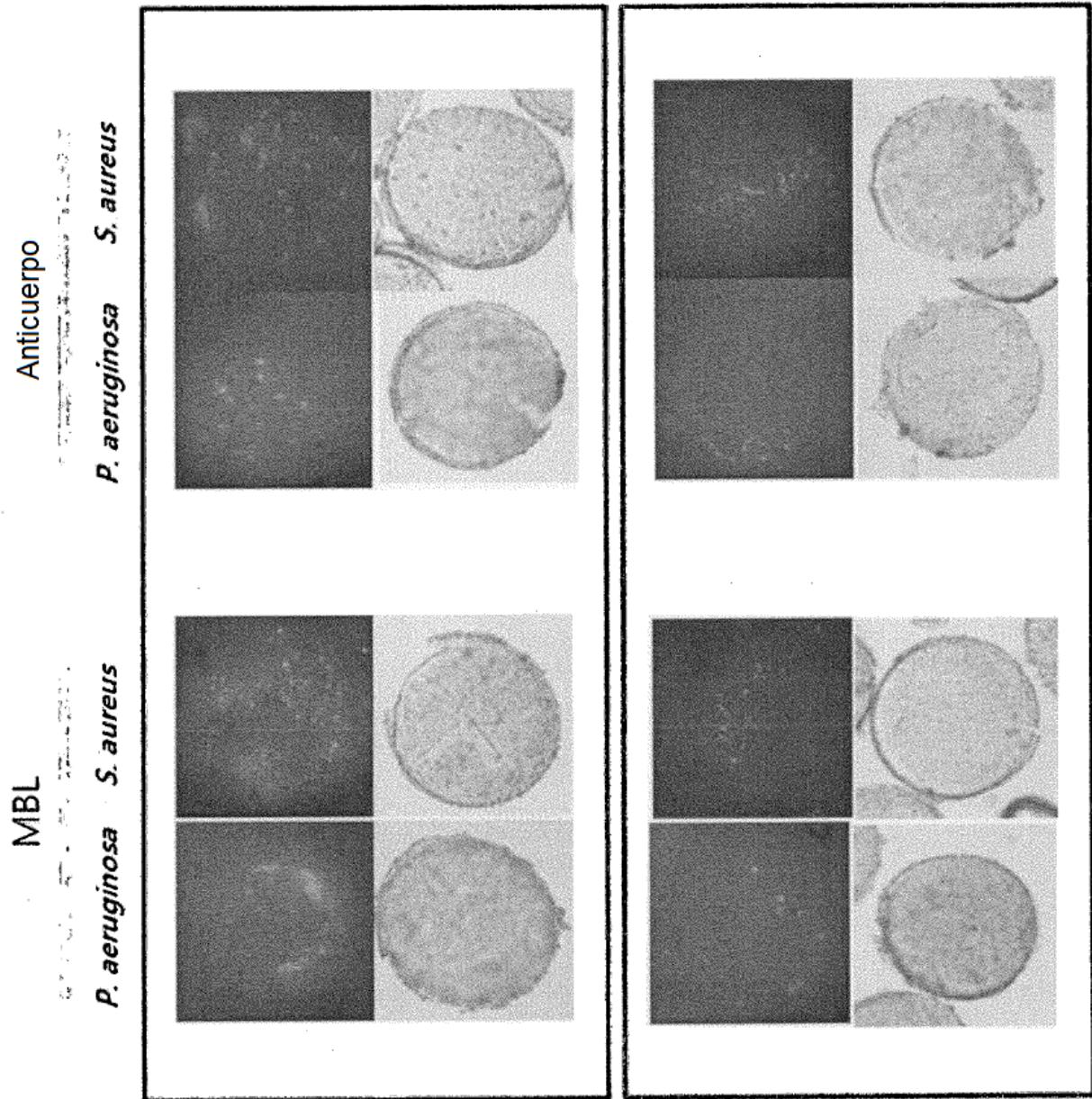


Fig. 4

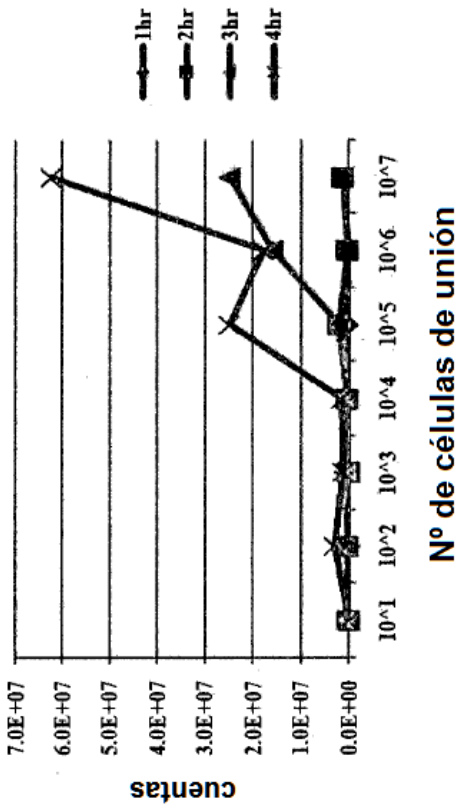


Comparación de la capacidad de las microestructuras con anticuerpo de adherir microorganismos con la de las microestructuras con MBL

Comparación de la capacidad de las microestructuras con anticuerpo de desprender microorganismos con la de las microestructuras con MBL

Fig. 5

(b) Perla con anticuerpo
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



(a) Perla con MBL
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

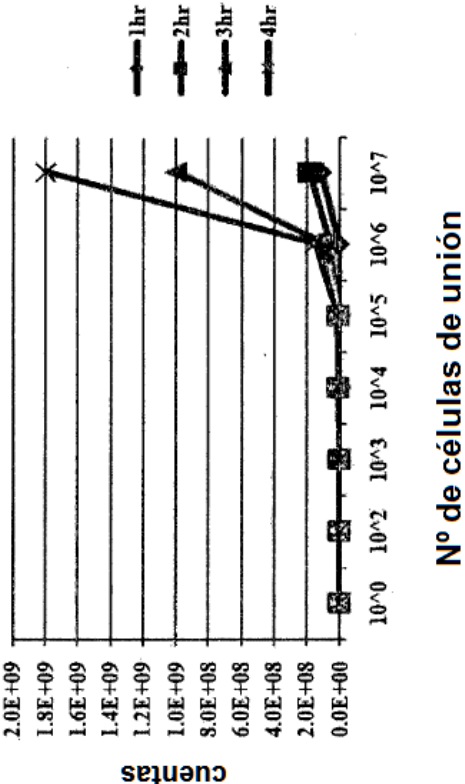
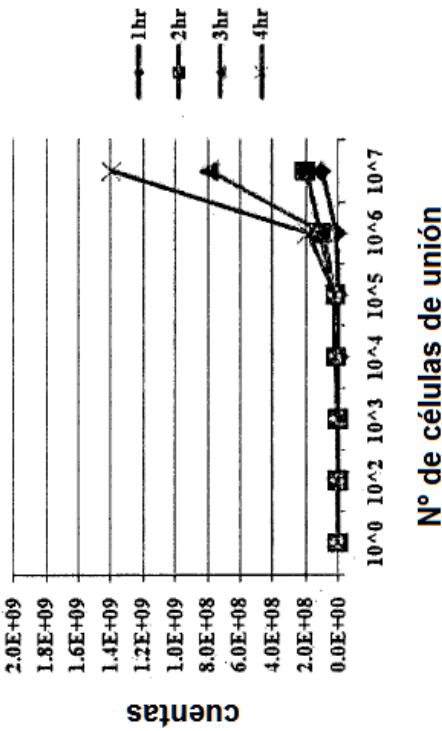


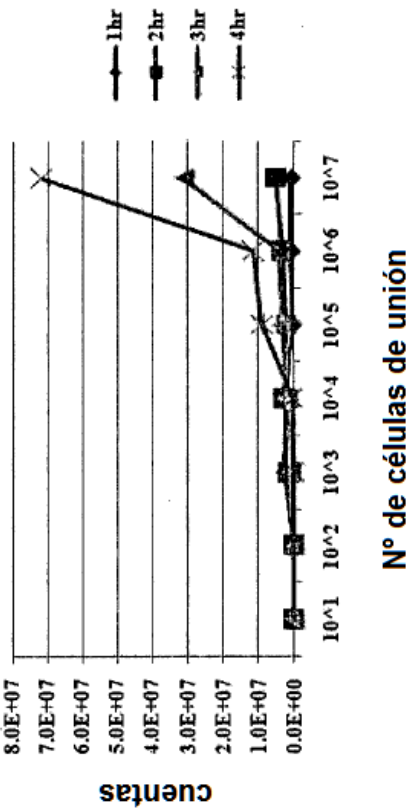
Fig. 6

(a) Perla con MBL
Staphylococcus aureus ATCC 29213



	1hr	2hr	3hr	4hr
10 ⁰	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.6E+05
10 ²	0.0E+00	2.6E+06	0.0E+00	3.2E+05
10 ³	0.0E+00	2.6E+06	6.4E+05	8.0E+05
10 ⁴	0.0E+00	1.6E+07	1.6E+07	1.7E+07
10 ⁵	9.6E+05	1.6E+07	2.2E+07	2.3E+07
10 ⁶	1.2E+07	1.1E+08	9.2E+07	1.8E+08
10 ⁷	1.1E+08	2.0E+08	8.0E+08	1.4E+09

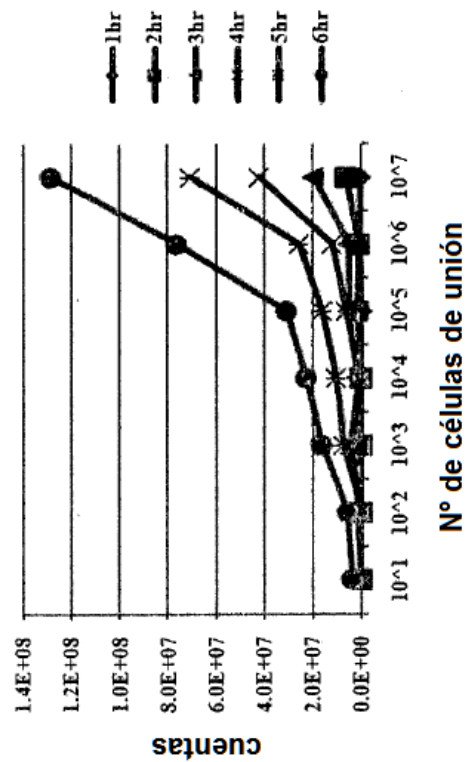
(b) Perla con anticuerpo
Staphylococcus aureus ATCC 29213



	1hr	2hr	3hr	4hr
10 ⁰	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
10 ¹	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
10 ²	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
10 ³	2.8E+06	1.4E+06	8.8E+05	0.0E+00
10 ⁴	2.5E+06	3.0E+06	1.9E+06	6.3E+05
10 ⁵	5.0E+05	2.3E+06	3.5E+06	9.0E+06
10 ⁶	8.8E+05	3.5E+06	4.3E+06	1.1E+07
10 ⁷	8.8E+05	5.3E+06	3.1E+07	7.2E+07

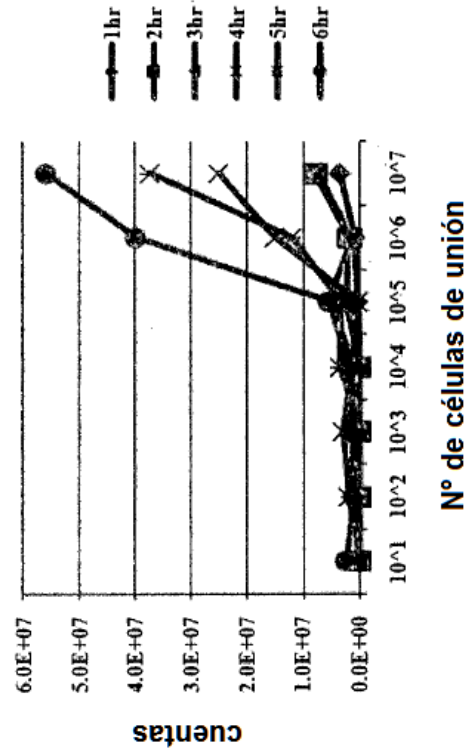
Fig. 7

(a) Perla con MBL
Enterococcus faecalis ATCC 29212



Nº de células de unión

(b) Perla con anticuerpo
Enterococcus faecalis ATCC 29212



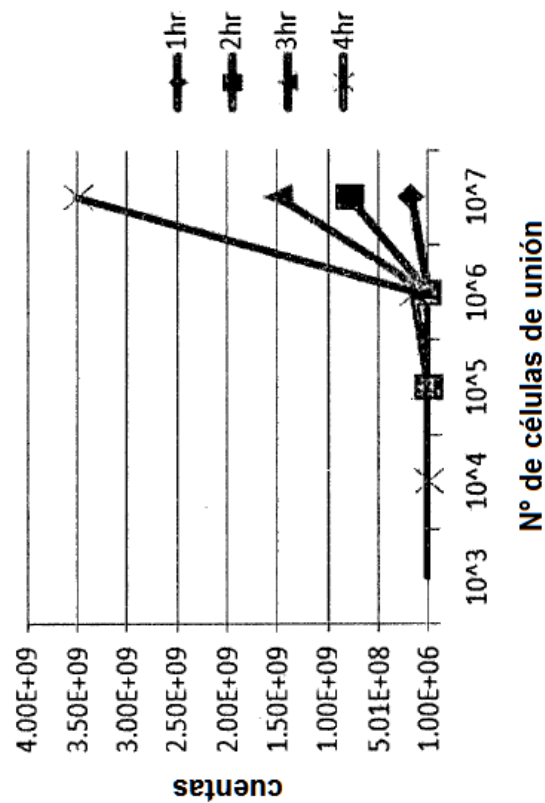
Nº de células de unión

	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr
10 ¹	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	5.0E+05	5.0E+05	4.0E+06
10 ²	0.0E+00	0.0E+00	1.5E+06	1.0E+06	0.0E+00	6.0E+06
10 ³	0.0E+00	0.0E+00	1.0E+06	4.5E+06	7.5E+06	1.7E+07
10 ⁴	0.0E+00	0.0E+00	1.5E+06	1.0E+06	1.1E+07	2.3E+07
10 ⁵	0.0E+00	1.5E+06	5.0E+06	6.5E+06	1.7E+07	3.1E+07
10 ⁶	1.0E+06	1.0E+06	5.0E+06	1.2E+07	2.6E+07	7.7E+07
10 ⁷	5.0E+05	6.5E+06	2.0E+07	4.2E+07	7.1E+07	1.3E+08

	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr
10 ¹	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	2.5E+06
10 ²	0.0E+00	0.0E+00	1.5E+06	2.0E+06	0.0E+00	1.0E+06
10 ³	0.0E+00	0.0E+00	1.0E+06	3.0E+06	0.0E+00	1.5E+06
10 ⁴	0.0E+00	0.0E+00	1.0E+06	1.5E+06	3.5E+06	2.0E+06
10 ⁵	5.0E+05	2.5E+06	5.5E+06	5.0E+05	3.5E+06	5.5E+06
10 ⁶	1.0E+06	2.0E+06	1.5E+06	1.5E+07	1.2E+07	4.0E+07
10 ⁷	3.5E+06	8.0E+06	7.5E+06	2.5E+07	3.8E+07	5.6E+07

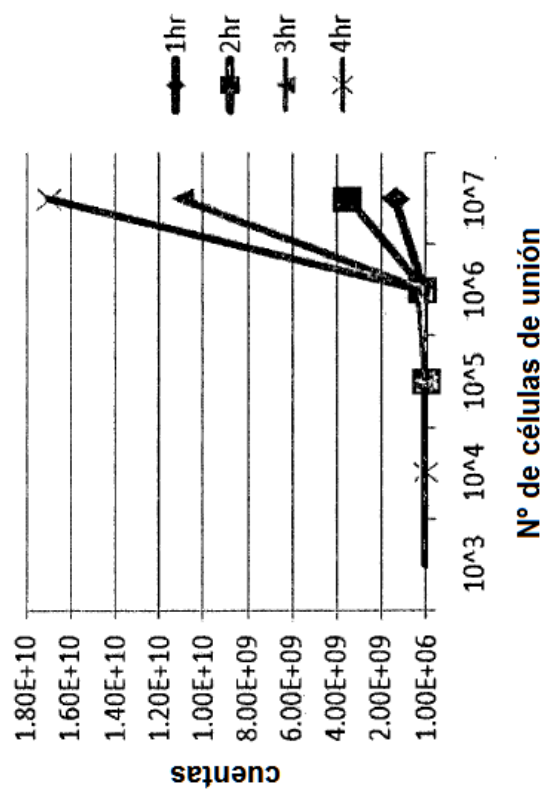
Fig. 8

(b) Perla con anticuerpo
Escherichia coli ATCC 25922



	1hr	2hr	3hr	4hr
10 ³	3.0E+03	6.0E+03	9.0E+03	2.2E+04
10 ⁴	7.0E+04	1.5E+05	2.9E+05	1.1E+06
10 ⁵	1.0E+05	1.4E+06	4.9E+06	1.0E+07
10 ⁶	1.1E+07	1.4E+07	2.4E+07	1.5E+08
10 ⁷	1.8E+08	7.9E+08	1.5E+09	3.5E+09

(a) Perla con MBL
Escherichia coli ATCC 25922



	1hr	2hr	3hr	4hr
10 ³	0.0E+03	6.0E+03	3.6E+04	1.1E+05
10 ⁴	7.0E+04	1.9E+05	3.2E+05	1.2E+06
10 ⁵	4.8E+06	1.1E+07	1.5E+07	3.0E+07
10 ⁶	1.1E+08	1.2E+08	2.4E+08	4.5E+08
10 ⁷	1.4E+09	3.5E+09	1.1E+10	1.7E+10