

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 943**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01D 61/18 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2009 PCT/US2009/047448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10002579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09774031 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2310127**

54 Título: **Dispositivo de extracción de bacterias/ARN**

30 Prioridad:

30.06.2008 US 215814

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

04.04.2018

73 Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US**

72 Inventor/es:

MARSCHKE, DEAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 661 943 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

Dispositivo de extracción de bacterias/ARN

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y un procedimiento para la recolección y lisis de especies microbiológicas para liberar ácidos nucleicos tales como el ARN y ADN.

Antecedentes

10 La detección y control de microorganismo son importantes en muchos campos incluyendo la atención sanitaria, regulación ambiental, guerra biológica, identificación de agentes patógenos, ensayo de alimentos y fármacos y en una variedad de sistemas industriales. En la industria, la presencia de microorganismos indeseables disminuye la eficacia del equipamiento operativo y en último término aumenta el coste de los productos o servicios asociados. Además, como los microorganismos se multiplican rápidamente, la presencia de actividad microbiana también produce riesgos para la salud pública. Existe un problema creciente con los organismos patógenos que infectan el agua y los procedimientos y que crean un creciente riesgo para la salud de seres humanos, animales y el medio ambiente.

15 En las torres de refrigeración, por ejemplo, puede estar presente agua que alberga microorganismos patógenos, tales como *Legionella sp.* Si no se trata apropiadamente con biocidas preferidos, las partículas en aerosol que contienen los microorganismos pueden crear problemas extremos de salud por la inhalación de microorganismos en aerosol dando lugar a enfermedades tales como la fiebre de Pontiac o a veces enfermedad del legionario fatal producida por *Legionella pneumophila*. La detección de este y otros microorganismos es difícil, especialmente en el caso de sistemas de recirculación abierta del agua, tales como las torres de refrigeración debido a la baja concentración representa un riesgo para la salud grave y se deben concentrar grandes volúmenes de agua en volúmenes de muestra más pequeños con el fin de llevar a cabo el ensayo analítico deseado y obtener resultados precisos y reproducibles. Se hace referencia al documento US 2004/0076980 A1, que enseña un procedimiento para separar ADN extracromosómico del ARN incluyendo el lisado de células que comprenden el ADN extracromosómico para formar un lisado y lisado circulante.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un aparato como se define en la reivindicación 1.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "especie diana" puede comprender organismos microbiológicos tales como material celular y virus. El material celular, por ejemplo, se escoge de entre bacterias, algas, hongos, procariontes, etc. Como se sabe, en los organismos celulares, el material diana, los ácidos nucleicos, tales como el ADN y ARN, se localiza dentro de la célula. En un virus, el material diana de ácido nucleico se localiza en una proteína de revestimiento. "Lisado" es entonces una ruptura de la célula o proteína de revestimiento para liberar el ácido nucleico diana.

35 Otra realización ejemplar se refiere a un procedimiento para la recolección de un material diana deseado a partir de una muestra líquida como se define en la reivindicación 8.

La invención se describirá adicionalmente en conjunción con el dibujo adjunto.

Breve descripción del dibujo

La Figura 1 es una vista de un corte transversal esquemático de un aparato de acuerdo con la invención.

Descripción detallada

40 Volviendo a la Figura 1, se muestra un dispositivo desechable 2 que se utiliza para capturar especies diana tales como bacterias y posteriormente se lisan las bacterias para retirar el ARN. El dispositivo comprende un conducto de flujo principal 4. El conducto de flujo principal incluye na entrada 12 corriente arriba y termina en una salida 14 corriente abajo. Se proporciona un segmento discontinuo 6 en el conducto de flujo principal y este segmento discontinuo tiene un accesorio 8 corriente arriba y un accesorio 10 corriente abajo adaptado para la recepción ajustada en los mismos de un cartucho de filtro 16. Los accesorios pueden ser uno cualquiera o más de los tipos convencionales tales como a rosca, llave de bola, Y-T, conector de manguera y otros conectores herméticos a fluidos.

50 El cartucho del filtro alberga un medio filtrante 18 dentro. Como se muestra, el cartucho comprende un bastidor 20 compuesto preferentemente de plástico rígido y tiene un accesorio interior 22 y un accesorio exterior 22. Los accesorios 22, 24 se adaptan para la recepción de una manguera en el accesorio corriente arriba 8 y accesorio corriente abajo 10 del conducto de flujo principal. En algunos casos, puede ser deseable proporcionar un cartucho moldeado co-insertado o insertado en el que el filtro moldeado está co-insertado o insertado en el alojamiento.

- Se proporciona un conducto de re-circulación 30 preferentemente de goma o material flexible similar. Preferentemente el conducto se puede penetrar con una aguja hipodérmica o similar. El conducto de recirculación 30 se comunica de manera hermética con el conducto de flujo principal 4 por el puerto de conducto 32 corriente arriba y por el puerto de conducto 34 corriente abajo. Se proporciona un área de recolección o depósito 36 en el conducto de re-circulación y está adaptado para la penetración de una jeringa hipodérmica de manera que se pueda extraer el material desde el conducto de re-circulación. Se puede proporcionar una bomba 40 en el conducto de recirculación y es preferentemente una bomba de tipo peristáltico bidireccional. Se pueden mencionar ejemplarmente muchos tipos variados de bombas. Es deseable que no haya un contacto directo de la bomba con el bucle de recirculación para se pueda desechar éste después de su uso.
- Como se muestra, se puede proporcionar una válvula de control de la recirculación 70 en la parte corriente arriba del conducto de re-circulación. También se puede proporcionar una válvula de control 50 en la parte interior del conducto de flujo principal y se proporciona una válvula de control 60 en la parte exterior del conducto 4 que se polariza en la posición cerrada mediante el resorte 62. La válvula 50 puede proporcionarse con un resorte polarizado para evitar el reflujo en el evento del bucle de re-circulación que se expande debido al desarrollo de algo de presión que supere la polarización de la válvula de control 60. La posición del conducto de salida 14 se podría variar del que se muestra en el dibujo para asegurar que una parte del filtrado, antes del lisado, se recolecte en el depósito para proporcionar un medio que se bombee. De esta manera se podría añadir un agente de lisis concentrado en el depósito por inyección en el sistema.
- El medio de filtro 18 se proporciona con tamaños de poro que se escogen de manera que las especies diana que contienen el material diana deseado se captura como retenido en el mismo. Sin embargo, después de que la especie diana se lisa o destruye, el material, tal como el ARN, se libera de las células o del revestimiento proteico pasa a través de la membrana como un filtrado.
- El medio de filtro 18 puede ser cualquiera de una variedad de membranas de filtro diseñadas para mantener las especies biológicas deseadas diana en el mismo. Ejemplos no limitantes del material de la membrana comprenden nilón, inoxidable, ésteres de celulosa, y ésteres, PTFE, fibra vegetal, polipropileno, cloruro de polivinilo, copolímero acrílico hidrófilo, poliéter sulfona, y policarbonato, etc. El tamaño de estos filtros puede estar en el orden de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 5,0 nm. Una membrana especialmente preferida para utilizar en el recolección de células de *Legionella pneumophila* es una membrana de fibra de vidrio disponible en Millipore que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 2,7 um.
- Se debería mencionar que en otra realización ejemplar del procedimiento, se puede proporcionar una etapa de pre-filtrado en la que, antes de la entrada en el dispositivo 2, la muestra de fluido se puede pasar a través de uno o más pre-filtros para retirar componentes inorgánicos y biológicos grandes mientras que pasa la especie diana como un filtrado. Estas membranas pueden estar compuestas, por ejemplo, por el mismo tipo de materiales expuestos anteriormente para su uso como el medio de filtro 18, pero los tamaños de poro deberían ser mayores, del orden de aproximadamente 1 a 100 um, más preferentemente aproximadamente 1 a 50 um. Se puede mencionar un par de filtros en tándem con un filtro corriente arriba con un tamaño de aproximadamente 20 um y un filtro corriente abajo con un tamaño de poro de 11 um como ejemplar.
- En la operación, aproximadamente 500 ml de fluido de muestra que contenga las especies diana que a su vez, encapsulan en material diana, entran mediante el tubo de entrada y se para a través de la capsula filtrante. Se puede utilizar el vacío o similar para ayudar al flujo del fluido a través del filtro aplicando en vacío en el puerto de salida. En una realización ejemplar, al medio del filtro se le da un tamaño para retener las células bacterianas de *Legionella* permitiendo al mismo tiempo el paso del ARN del lisado.
- Después de que la muestra se pase a través del dispositivo, se aplica un agente de lisis al sistema y pasa a través del conducto de re-circulación 30 propulsado por la acción de la bomba 40. El agente de lisis se puede admitir a través del conducto de entrada 12 o puede inyectarse simplemente en el conducto de re-circulación 30 mediante una jeringa o similar. La bomba puede funcionar en cualquier dirección o se puede utilizar la bomba en combinación con una válvula de control para evitar que la muestra inicial se salte el dispositivo de filtración. Después de un periodo de tiempo, el tampón de lisis o solución de lisis del conducto de re-circulación rompe la especie diana capturando el materia en el medio de filtro y el ARN de la célula diana puede entonces retirarse del dispositivo utilizando una jeringa que extrae el fluido directamente del conducto de re-circulación tal como por ejemplo en el área de recolección 36, o, el fluido se puede extraer el tubo de salida. El ARN puede analizarse entonces por cualquiera de una variedad de técnicas de ensayo convencionales. El agente de lisis se puede aplicar de varias maneras. El agente de lisis puede insertarse a través de 12, inyectarse en el depósito 36, o insertarse mediante un puerto adicional añadido al bucle. Si se aplican grandes volúmenes de agente de lisis, se puede abrir la válvula de control 60 perdiendo material diana a menos de que el bucle de re-circulación se evacúe antes mediante un medio de vacío como se expone anteriormente.
- La válvula de control en la entrada evita que el fluido se salga por la entrada durante la etapa del ciclo de recirculación y una válvula de muelle polarizado en la salida permite sellar la salida a menos de que se aplique una ligera presión para extraer el fluido. También puede ser deseable una relajación del resorte de la válvula de control 50. La bomba 40 funciona de manera que la presión generada sea de manera que no supere la relajación del resorte

de la válvula de control de salida.

5 Como agente de lisis que se emplea, se puede utilizar cualquiera que tenga un efecto de rotura de la membrana celular o el revestimiento proteínico del virus. Los detergentes son un ejemplo no limitante de productos químicos que se utilizan comúnmente para destruir una membrana de doble capa lipídica para liberar los contenidos celulares y lisar la proteína de membrana, y ejemplos no limitantes de productos químicos de lisis son el dodecil sulfato de litio, CHAPS, Tween-20E, NP40, CTAB, PVPP, la serie de detergentes Triton X, colato sódico, y desoxicolato sódico, cloruro de guanidinio o cáusticos. Los agentes caotrópicos como las sales de guanidinio también pueden actuar como agentes de lisis en este sistema. La eficacia de lisis de los detergentes y agentes de lisis alternativos dependen de los tipos celulares y las aplicaciones específicas, pero todos los materiales ensayados muestran una lisis adecuada en los tiempos necesarios para este procedimiento de ensayo. Se pueden incluir enzimas tales como lisozimas, mutanolisina, labiasa, lisostafina, liticasa, proteinasa K, endolisina, y acromopeptidasas como reactivos de lisis o aditivos para aumentar la lisis. También se podrían incluir disolventes orgánicos, tales como DMSO, DMF como reactivos de lisis o aditivos para aumentar la lisis. Una variedad de proveedores en biociencia ofrecen una amplia colección de tampones de lisis adecuados para su aplicación en lisis celular. Se podría añadir cualquier procedimiento físico tales como agitado, calentamiento, corte y homogeneización, etc., en el proceso para aumentar la eficacia de la lisis. En el momento presente una solución de lisis comprende una concentración diluida de lauril sulfato de litio, nonil-fenol (etoxilación de 40 moles) y DMSO puede mencionarse como una solución de lisis ejemplar que recircula a través del dispositivo.

20 Como se ha señalado anteriormente, en otras realizaciones distintas, el conducto de salida se puede posicionar para permitir la salida de aire del depósito y mantener una parte del fluido filtrado antes de la aplicación del agente de lisis. Por ejemplo, el conducto de lisis podría posicionarse corriente abajo dese el filtro junto con la parte derecha del aparato como se muestra en el dibujo, que se comunica con el conducto 4 y se extiende formando un ángulo hacia arriba del mismo. Adicionalmente, se pueden proporcionar medios de válvulas distintas en comunicación con el conducto de flujo del fluido, conducto del agente de lisis o el depósito para proporcionar la extracción del material diana deseado.

REIVINDICACIONES

1. Aparato de recolección de un material diana de una muestra líquida que comprende una especie diana que es un organismo celular y que contiene dicho material diana en el mismo, comprendiendo dicho aparato
 - 5 (a) un conducto de flujo de fluido (4) que tiene una entrada (12) corriente arriba y una salida (14) corriente abajo;
 - (b) un medio de filtrado (18) entre dicha entrada del flujo de fluido (12) y dicha salida (14) corriente abajo; teniendo dicho medio de filtrado (18) un tamaño de poro adaptado para retener dicha especie en él y que pase, como un filtrado, el lisado que contiene dicho material diana;
 - 10 (c) un conducto de agente de lisis para suministrar el agente de lisis a dicho medio de filtrado (18) para lisar dicha especie diana de manera que libere dicho material diana, en el que dicho conducto del agente de lisis comprende un conducto de recirculación (30), que tiene un primer puerto (32) que comunica dicho conducto de flujo de fluido (4) corriente arriba de dicho medio de filtrado (18) y un segundo puerto (34) que comunica dicho conducto de flujo de fluido (4) corriente abajo de dicho medio de filtrado (18), **caracterizado porque** se proporciona un área de recolección o depósito (36) en el conducto de re-circulación (30) y está adaptado para la penetración por una jeringa hipodérmica de manera que se puede extraer el material desde el conducto de re-circulación (30).
2. Aparato como se define en la reivindicación 1 que comprende además una bomba (40) conectada operativamente a dicho conducto de re-circulación del agente de lisis para bombear dicho agente de lisis hacia dicho medio de filtrado (18) y recirculando dicho lisado a través de dicho aparato.
3. Aparato como se define en la reivindicación 1 en el que dicho conducto de flujo de fluido (4) comprende un segmento discontinuo (6) con un accesorio (8) corriente arriba y un accesorio (10) corriente abajo, comprendiendo dicho aparato un alojamiento que contienen dicho medio de filtrado (18) y definiendo un cartucho con un accesorio interno y un accesorio externo en la respectiva, recepción ajustada del fluido en dicho accesorio (8) corriente arriba y dicho accesorio (10) corriente abajo de dicho segmento discontinuo.
4. Aparato como se define en la reivindicación 1 en el que dicho conducto de recirculación del agente de lisis comprende un área de recolección (36) agrandada.
5. Aparato como se define en la reivindicación 2 en el que dicha bomba (40) comprende una bomba bidireccional.
6. Aparato como se define en la reivindicación 1 en el que dicho medio de filtrado (18) comprende poros que tienen tamaños que varían desde aproximadamente 10 nm a 5,0 um.
7. Aparato como se define en la reivindicación 6 en el que dicho medio de filtrado (18) es un filtro de fibra de vidrio.
- 30 8. Un procedimiento de recolección de un material diana de una muestra líquida que puede comprender una especie diana que es un organismo celular y que contienen dicho material diana en el mismo, comprendiendo dicho procedimiento
 - 35 (a) hacer pasar dicha muestra líquida a través de una membrana filtrante que tiene un tamaño de poro adaptado para retener dicha especie diana en la misma y pasar como filtrado, el lisado que contiene el material diana;
 - (b) proporcionar un conducto del agente de lisis en comunicación con dicha membrana filtrante;
 - (c) hacer fluir un agente de lisis a través de dicho conducto del agente de lisis para ponerlo en contacto y lisar dicha especie diana; de manera que dicha especie diana lisada libera dicho material diana; y
 - 40 (d) recolectar dicho material diana, en el que dicho agente de lisis se bombea a dicha membrana filtrante a través del tubo de recirculación del flujo, comprendiendo dicho procedimiento la recirculación de dicho agente de lisis a través de dicha membrana de filtrado en el que se proporciona un área de recolección o depósito en el tubo de recirculación del flujo y en el que dicho material diana se recolecta por extracción del mismo por penetración de dicha área de recolección o depósito mediante una aguja hipodérmica.
9. Un procedimiento como se define en la reivindicación 8 en el que dicha membrana de filtrado tiene un tamaño de poro de aproximadamente 10 nm a 5 um y dicha especie diana comprende *Legionella pneumophila*.
- 45 10. Un procedimiento como se define en la reivindicación 9 en el que dicha membrana de filtrado es una membrana de filtrado de fibra de vidrio.
11. Un procedimiento como se define en la reivindicación 9 en el que dicho material diana es ARN o ADN.
12. Un procedimiento como se define en la reivindicación 8 en el que dicho organismo celular se escoge de bacterias, algas, hongos y procariotas.
- 50 13. Un procedimiento como se define en la reivindicación 8 en el que dicho material diana comprende material intracelular.

14. Un procedimiento como se define en la reivindicación 13 en el que dicho material diana comprende un ácido nucleico.

15. Un procedimiento como se define en la reivindicación 8 en el que dicha especie diana es materia vírica y en el que dicho material diana está envuelto en un revestimiento proteico, siendo dicho material diana un ácido nucleico.

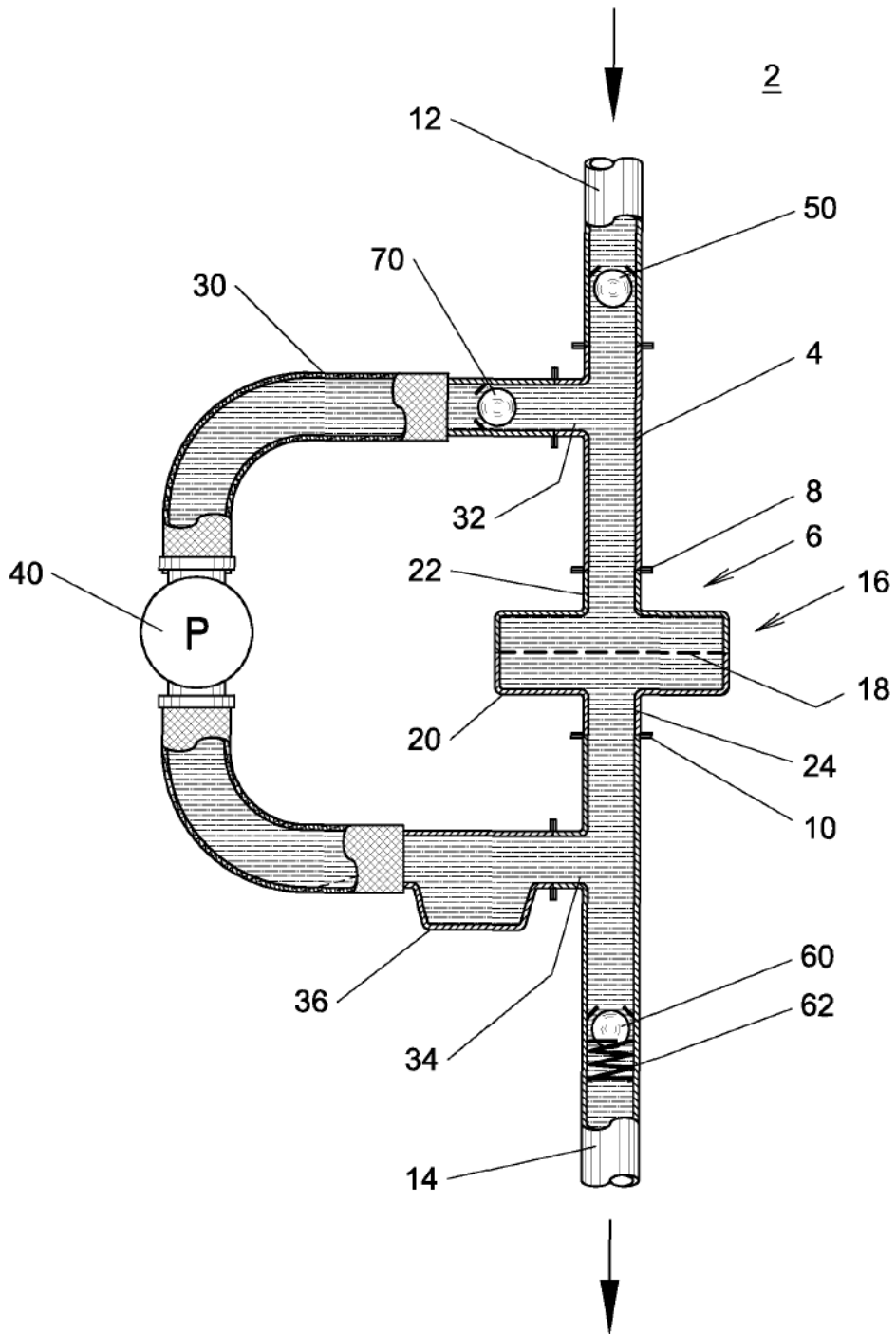


FIG. I