

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 032**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011 PCT/US2011/065449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12083150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11808482 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2651561**

54 Título: **Métodos de aislamiento, acumulación, caracterización y/o identificación de microorganismos utilizando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra, y dicho dispositivo**

30 Prioridad:

17.12.2010 US 201061424418 P

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

24.09.2018

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX, INC (100.0%)
100 Rodolphe Street
Durham, NC 27712, US**

72 Inventor/es:

**WALSH, JOHN;
HYMAN, JONES y
RONSICK, CHRISTOPHER, S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 683 032 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

Métodos de aislamiento, acumulación, caracterización y/o identificación de microorganismos utilizando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra, y dicho dispositivo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para aislar, acumular, caracterizar y/o identificar microorganismos en una muestra de ensayo. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método que hace uso de un dispositivo de filtración y transferencia de muestras para el aislamiento, la acumulación, la transferencia y la posterior caracterización y/o identificación de microorganismos en una muestra de ensayo. En otro aspecto, la presente invención se refiere a dispositivos para aislar, acumular y/o purificar microorganismos a partir de una muestra.

Antecedentes de la invención

15 La detección de microorganismos patógenos en fluidos biológicos debe realizarse en el menor tiempo posible, en particular en el caso de la septicemia, cuya mortalidad sigue siendo elevada a pesar de la amplia gama de antibióticos disponibles para los médicos. La presencia de agentes biológicamente activos, tales como un microorganismo en el fluido corporal de un paciente, especialmente en la sangre, generalmente se determina utilizando frascos de hemocultivo. Las infecciones en el torrente sanguíneo se asocian con una alta morbilidad y mortalidad y, sin embargo, los métodos de diagnóstico actuales, cultivos seguidos por identificación bioquímica y pruebas de susceptibilidad a antibióticos, pueden tardar varios días en completarse. En general, la terapia empírica se inicia en función de los síntomas clínicos, y los resultados de las pruebas solamente influyen sobre las decisiones de los facultativos cuando falla la terapia inicial. La capacidad para caracterizar infecciones en el torrente sanguíneo en las primeras horas, preferiblemente no más tarde de una hora después de un resultado de hemocultivo positivo, aumentaría significativamente la importancia clínica de la información de diagnóstico proporcionada. Se han propuesto métodos de amplificación molecular para satisfacer esta necesidad, pero subsisten serias dificultades con respecto a esta técnica. El caldo de hemocultivo positivo representa en sí mismo una población naturalmente amplificada de microorganismos con potencial para uso en una variedad de pruebas de identificación (ID) rápidas.

25 Las pruebas de ID fenotípicas automatizadas tradicionales, tales como los sistemas Vitek®, Phoenix™ y Microscan®, o las pruebas fenotípicas manuales, tales como API, requieren que los microorganismos se encuentren en una fase de crecimiento adecuada y libres de la interferencia de productos del medio y de la sangre a fin de proporcionar resultados concluyentes. Estos sistemas emplean colonias que han crecido en caldo positivo durante 18-24 horas en medios para cultivo en placas. Sin embargo, en un esfuerzo por obtener resultados más rápidos, algunos laboratorios han dado a conocer el uso de estos sistemas con microorganismos aislados a partir de frascos de hemocultivos positivos. Estas pruebas directas desde el frasco no son adecuadas para todos los microorganismos (por ej., cocos Gram-positivos), no están validadas por los fabricantes de la prueba, y en general tardan 3-8 horas en dar resultados. Se necesitan con urgencia pruebas más rápidas y más específicas a fin de proporcionar al médico los resultados clínicamente relevantes dentro de las primeras horas, preferiblemente dentro de la primera hora después de un resultado de cultivo positivo.

40 Los métodos de espectrometría de masas tienen el potencial de permitir la identificación de microorganismos muy rápidamente, pero pueden encontrar interferencia de muchos compuestos presentes en medios de cultivos microbiológicos líquidos y en muestras clínicas, tales como sangre, o combinaciones de los mismos. Los métodos más comúnmente empleados para recuperar microorganismos directamente a partir del caldo de hemocultivo positivo son la centrifugación diferencial de dos etapas y la centrifugación en un tubo separador de suero.

Se han descrito otros métodos para la separación, caracterización y/o identificación de microorganismos, que incluyen:

45 La patente de EE.UU. N° 6.177.266 revela un método para la clasificación quimiotaxonómica de bacterias con biomarcadores específicos de género, especie y cepa generados mediante análisis por espectrometría de masas por tiempo de vuelo y fuente de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS por su versión en inglés "matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry") con extractos de proteína celular o células completas.

50 En la patente de EE.UU. N° 7.070.739 se presenta un método para extraer, separar y purificar microbios que incluyen virus mediante ultra-centrifugación bidimensional directamente a partir de fluidos corporales o tejido homogeneizado. En una primera etapa de centrifugación, se separan todas las partículas cuya velocidad de sedimentación es mayor que las de los microbios a ser identificados. En la segunda etapa de ultracentrifugación, se utiliza la banda isopícnica en líquidos que se introducen para formar un gradiente de densidad de amplio rango, utilizando tubos centrífugos dentados especiales. Según la patente, la técnica de separación puede emplearse para detectar partículas en bandas mediante dispersión de luz o fluorescencia usando tintes específicos de ácidos nucleicos, y para recuperar las partículas en bandas en volúmenes muy pequeños para la caracterización por espectrometría de masas de subunidades de proteínas virales y partículas virales intactas, y por determinación

citométrica de flujo fluorescente tanto de la masa del ácido nucleico como de las masas de fragmentos producidos por enzimas de restricción.

5 EP0533912A describe un aparato de pretratamiento de muestras y un método para dializar fluido y orina. La solicitud de patente describe el uso de un pre-filtro de poros de gran tamaño para separar sedimentos urinarios típicos, tales como células sanguíneas, células epiteliales, cilindros, mocos y cristales. Cualquier bacteria presente pasa a través del pre-filtro y es capturada en un segundo filtro descendente. Posteriormente se tiene acceso a las bacterias capturadas desmontando manualmente del dispositivo.

10 La solicitud de patente de EE. UU. N° de Pub. 2007/0175278 describe el uso de un medio de cultivo líquido para cultivar una muestra de interés, que incluye, por ejemplo, sangre, orina, heces, catéteres intravenosos, líneas de producción industrial, sistemas de aguas, un producto alimentario, un producto cosmético, un producto farmacéutico, y una muestra forense. Posteriormente, los microorganismos pueden recolectarse del medio líquido mediante métodos conocidos en la técnica, por ej., por centrifugación. Los microorganismos concentrados pueden transferirse después al material portador, opcionalmente después del secado, para obtener un espectro vibracional. La solicitud de patente describe varios métodos para identificar y clasificar microorganismos, que incluyen espectroscopia vibracional, tal como la espectroscopia Raman.

15 Sin embargo, estos métodos presentan varias desventajas cuando se intenta separar y caracterizar microorganismos a partir de algunas muestras de ensayos clínicos (por ej., muestras complejas tales como medios de cultivo que contienen sangre). En el caso de medios de cultivo que contienen sangre, las preparaciones microbianas resultantes a menudo contienen glóbulos rojos, plaquetas, partículas de lípidos, enzimas en plasma y desechos celulares contaminantes, que pueden producir resultados deficientes. Estos métodos son también muy laboriosos e inseguros debido a etapas que pueden dar como resultado la exposición al aerosol de patógenos potencialmente peligrosos para el usuario.

20 La solicitud de patente de EE. UU. N° de Pub. 2010/0120085, del mismo cesionario que la presente, describe métodos para separar, caracterizar y/o identificar microorganismos en una muestra de ensayo. El método describe un procedimiento de preparación de la muestra que comprende una etapa de lisis selectiva y una etapa subsiguiente de separación para el aislamiento y la purificación de un microorganismo desconocido a partir de una muestra de ensayo para la identificación del microorganismo mediante espectrometría de masas. La solicitud también describe el uso de filtración para el aislamiento y la purificación de un microorganismo desconocido a partir de una muestra de ensayo.

30 La patente de EE.UU. N° 5833927A revela un dispositivo para capturar un componente presente en un fluido, en donde el dispositivo es una punta de pipeta que tiene un extremo posterior adaptado para ajustarse sobre una micro-pipeta, y un extremo anterior con una membrana, adaptado para unirse al componente, que se extiende a través de la punta de pipeta.

35 La patente de EE.UU. N° 4999164 A revela un dispositivo de pipeteo que comprende un cono de retención para sostener una punta de pipeta deslizante y una cámara de pistón, que se comunica con un pasaje del cono de retención y contiene un pistón recíproco, que actúa sobre la punta de pipeta que se ha ajustado en el cono de retención. Se proporciona un filtro en el dispositivo que consiste en un filtro de retención de aerosol que está ensamblado en forma desmontable en una región que comprende el extremo inferior del dispositivo de pipeteo, incluyendo el cono de retención, así como la porción de extremo más alto de la punta de pipeta debajo del cono de retención. El filtro puede diseñarse de diversas formas y puede tener una acción de filtro progresivo. El filtro puede disponerse en el extremo más bajo del cono de retención o en la punta de pipeta o en un miembro interpuesto.

40 En consecuencia, subsiste la necesidad de métodos, dispositivos y/o kits de preparación de muestras mejorados para el aislamiento y/o la acumulación de microorganismos a partir de muestras de ensayos clínicos, que sean compatibles con tecnologías de identificación rápida tales como la espectrometría de masas. Además, subsiste la necesidad de métodos, dispositivos y/o equipos de preparación de muestras mejorados para el aislamiento y/o la acumulación simultáneos de una pluralidad de microorganismos de una pluralidad de muestras de ensayos clínicos, que sean compatibles con las técnicas rápidas y automatizadas para la identificación de microorganismos. Los métodos y dispositivos aquí descritos producen una muestra limpia y concentrada de microorganismos que es óptima para su análisis, por ejemplo, mediante espectrometría de masas, especialmente para el análisis MALDI-TOF-MS.

50 Compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos y dispositivos de aislamiento, separación y/o acumulación para la subsiguiente caracterización y/o identificación de microorganismos en una muestra. Los métodos permiten la caracterización y/o identificación de microorganismos más rápidamente que las técnicas anteriores, con el resultado de diagnósticos más rápidos (por ej., en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene septicemia, meningitis o una infección del tracto urinario) e identificación más rápida de materiales contaminados (por ej., alimentos o productos farmacéuticos) o agua. Las etapas implicadas en los métodos de la invención, desde la obtención de una muestra hasta la caracterización y/o identificación de microorganismos, pueden llevarse a cabo en un marco de tiempo muy

corto para producir información procesable clínicamente relevante, por ej., en menos de aproximadamente 120 minutos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para aislar y posteriormente identificar un microorganismo en una muestra de ensayo, que comprende:

- 5 (a) proporcionar una muestra de ensayo que contiene a ciencia cierta o que puede contener microorganismos;
- (b) opcionalmente lisar células y/o material en partículas no microbiano en dicha muestra de ensayo produciendo una muestra lisada;
- (c) aislar dichos microorganismos de otros componentes de dicha muestra de ensayo o de dicha muestra lisada, y acumularlos, mediante filtración, utilizando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que comprende:
- 10 un cuerpo hueco y de forma alargada que tiene un primer extremo o punta que está provisto de, o tapado con, un material de filtración, en el que dicho material de filtración está situado adyacente y sobresale de dicho primer extremo o punta, y en el que dicho cuerpo alargado hueco está lleno o taponado con un adsorbente para proporcionar soporte al material de filtración, y
- 15 un segundo extremo operable para proporcionar flujo de fluido para filtración;
- (d) transferir dicha muestra de microorganismos aislados a un recipiente o portaobjetos adecuado para analizar y/o escudriñar dicha muestra de microorganismos aislados y acumulados;
- (e) analizar dicha muestra aislada o acumulada de dichos microorganismos para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dicho microorganismo; y
- 20 (f) caracterizar y/o identificar dichos microorganismos en dicha muestra aislada y acumulada en función de las mediciones obtenidas.

En este documento también se describe un método para aislar y posteriormente caracterizar y/o identificar un microorganismo en un hemocultivo, que comprende:

- 25 (a) obtener una muestra a partir de un hemocultivo que contiene a ciencia cierta o que puede contener microorganismos;
- (b) opcionalmente lisar células y/o material en partículas no microbiano en dicha muestra para producir una muestra lisada;
- (c) aislar dichos microorganismos de otros componentes de la muestra lisada, y acumularlos, mediante filtración, utilizando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado;
- 30 (d) transferir dicha muestra de microorganismos aislados a una placa de espectrometría de masas;
- (e) analizar dicha muestra aislada y acumulada de microorganismos por espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de dichos microorganismos; y
- (f) caracterizar y/o identificar dichos microorganismos en dicha muestra aislada y acumulada mediante comparación del espectro de masas adquirido con espectros de masas de referencia.

35 También se describe en este documento un método para aislar, y posteriormente caracterizar y/o identificar un microorganismo en una muestra de orina, que comprende:

- (a) obtener una muestra de orina que contiene a ciencia cierta o que puede contener microorganismos;
- (b) opcionalmente lisar células y/o material en partículas no microbiano en dicha muestra de orina para producir una muestra lisada;
- 40 (c) aislar dichos microorganismos de otros componentes de la muestra opcionalmente lisada, y acumularlos, mediante filtración, utilizando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado;
- (d) transferir dicha muestra de microorganismos aislados a un recipiente o portaobjetos adecuado para analizar y/o escudriñar dicha muestra de microorganismos aislada y acumulada;
- (e) analizar dicha muestra de microorganismos aislados o acumulados para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dicho microorganismo; y
- 45 (f) caracterizar y/o identificar dichos microorganismos en la muestra aislada y acumulada en función de las mediciones adquiridas.

5 La muestra aislada o acumulada de dichos microorganismos puede analizarse utilizando escudriñamiento espectroscópico, por ej., en base a características intrínsecas de los microorganismos (por ej., fluorescencia intrínseca) o la estructura vibracional de las moléculas constituyentes (por ej., espectroscopia Raman). En una realización de la invención, los microorganismos aislados o acumulados pueden analizarse por espectrometría de masas (por ej., MALDI-TOF MS).

10 De acuerdo con otra realización de la invención, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado puede comprender un cuerpo alargado y hueco (por ej., un tubo alargado y hueco cilíndrico, hexagonal o de configuración similar) que tiene un primer extremo o punta que comprende o está provisto de un material de filtración (por ej., una membrana de filtración), en donde dicho material de filtración está colocado adyacente a y sobresale de dicho primer extremo o punta, en donde dicho cuerpo alargado hueco está lleno de, o taponado con un adsorbente para proporcionar soporte al material de filtración, y un segundo extremo que funciona proporcionando flujo de fluido para la filtración. Por ejemplo, el segundo extremo puede estar destinado a la conexión con un sistema de vacío, una jeringa, un émbolo o dispositivo similar para generar un vacío. El cuerpo cilíndrico hueco comprende un cuerpo largo y angosto y puede ser de vidrio, plástico, metal u otro material similar. En aun otra realización, como una alternativa a la fuente de vacío, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra puede utilizar un adsorbente taponado internamente para proporcionar suficiente acción capilar y/o fuerza de succión para filtración y lavado. Por ejemplo, el adsorbente puede proporcionar filtración pasiva para proveer una acción capilar o fuerza de absorción para el flujo de fluido.

20 En otra realización, la presente invención también se refiere a una unidad de filtración y transferencia de muestra integrada que comprende una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados como se describe en el párrafo anterior con respecto al aislamiento y/o la acumulación de una pluralidad de muestras de ensayo y para la transferencia simultánea de la pluralidad de microorganismos aislados y/o acumulados a un recipiente, portaobjetos o placa para analizar dichos microorganismos aislados o acumulados.

25 Aquí también se describe un sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes que comprende una unidad de filtración que funciona para el aislamiento y/o la acumulación de microorganismos para una pluralidad de muestras de ensayo mediante filtración, y una unidad de transferencia que funciona para la transferencia simultánea de dicha pluralidad de microorganismos aislados y/o acumulados a un portaobjetos o placa para su análisis.

También se describe un kit para el aislamiento, la acumulación y/o la purificación de microorganismos a partir de una muestra de ensayo que comprende, en una combinación concentrada:

30 (a) opcionalmente un tampón de lisis selectivo para la lisis selectiva de los no microorganismos que se sabe están o pueden estar presentes en una muestra de ensayo;

(b) un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado en donde dicho dispositivo funciona para el aislamiento, la acumulación y/o la purificación de microorganismos de una muestra de ensayo, y para la subsiguiente transferencia de microorganismos a un recipiente, portaobjetos o placa para su análisis; y

35 (c) al menos un fluido o tampón de lavado para lavar la muestra de microorganismos aislados, acumulados y/o purificados. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado puede comprender un cuerpo alargado y hueco que tiene un primer extremo o punta que está provisto de o tapado con un material de filtración, en donde dicho material de filtración es adyacente y externo a dicho primer extremo o punta, y un segundo extremo para proporcionar flujo de fluidos para filtración.

40 La presente invención se explica con más detalle en las figuras que se adjuntan y la descripción a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una vista frontal de un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado, según la presente invención. La Figura 2B muestra una vista transversal del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que se muestra en la Figura 1A.

45 La Figura 2A muestra una vista frontal de un segundo concepto de diseño de un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado, según la presente invención. La Figura 2B muestra una vista transversal del dispositivo y la Figura 2C muestra una vista detallada de un primer extremo del dispositivo.

50 La Figura 3A muestra una vista en despiece ordenado del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que se ilustra en la Figura 2 y la Figura 3B muestra una vista detallada de un primer extremo del dispositivo.

La Figura 4 muestra una vista en perspectiva de una unidad de filtración y transferencia de muestra para el aislamiento y/o la acumulación de microorganismos en una pluralidad de muestras de ensayo.

La Figura 5 muestra una vista en despiece ordenado de la unidad de filtración y transferencia de muestra que se ilustra en la Figura 4.

La Figura 6 muestra una vista en despiece ordenado de una unidad de filtración, que comprende la primera parte de un sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

5 La Figura 7 muestra una vista en perspectiva de la unidad de filtración ilustrada en la Figura 6. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

La Figura 8 muestra una vista ampliada parcial de la unidad de filtración ilustrada en la Figura 6. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

10 Las Figuras 9A-D muestran vistas en perspectiva de una unidad de transferencia. Esto no se reivindica como parte de la presente invención. La Figura 9A muestra una vista en perspectiva de un portaobjetos o placa que se pone sobre la placa de junta inferior. La Figura 9B muestra una vista en perspectiva de la junta inferior y el portaobjetos o placa. La Figura 9C muestra una vista ampliada de la junta inferior alineada con el bloque de pasadores de transferencia. La Figura 9D muestra una vista en perspectiva de la posición de la placa de junta inferior en la parte superior del bloque de pasadores de transferencia y en alineamiento con el mismo.

15 La Figura 10 muestra una vista inferior de la superficie inferior de la placa superior de la unidad de filtración ilustrada en la Figura 6. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

La Figura 11 muestra una vista en despiece ordenado de la placa superior, junta o cinta intermedia y un bloque superior de la unidad de filtración ilustrado en la Figura 6. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

20 La Figura 12 muestra una vista en despiece ordenado y transversal de la placa superior, junta o cinta intermedia y un bloque superior de la unidad de filtración ilustrada en la Figura 6. Esto no se reivindica como parte de la presente invención.

La Figura 13 muestra una representación esquemática de un método que comprende una etapa de lisis, una etapa de separación y etapa de transferencia, facilitadas con el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de la Figura 1.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención puede comprender realizaciones diferentes y no debería interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas aquí en la descripción, sino que solamente está limitada por las presentes reivindicaciones. Sin embargo, estas realizaciones en la descripción se presentan aquí para que esta divulgación sea rigurosa y completa, y para trasladar completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización pueden incorporarse en otras realizaciones, y las características ilustradas con respecto a una realización particular pueden eliminarse de esa realización siempre que se encuentren contempladas en el alcance de las presentes reivindicaciones. Además, numerosas variantes y adiciones a las realizaciones sugeridas aquí resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, las que no se desviarán de la presente invención según se la define en las reivindicaciones adjuntas.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el entendido normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención pretende solamente describir las realizaciones particulares y no limitar la invención.

Definiciones

40 Como se emplea aquí, "un," "una," o "el", "la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.

También como se emplea aquí, "y/o" se refiere a e incluye cualquiera y la totalidad de las combinaciones posibles de uno o más de los ítems asociados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta como alternativa ("o").

45 Además, el término "aproximadamente", como se emplea aquí al referirse a un valor mensurable como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, dosis, tiempo, temperatura, y lo similar, incluirá variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o aun $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

50 Como se emplea aquí, el término "microorganismo" pretende incluir organismos que son generalmente unicelulares, que pueden ser multiplicados y manipulados en el laboratorio, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, levaduras, mohos, parásitos, y micoplasmas. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram-negativas de esta invención incluyen bacterias de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia*, *Achromobacter*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Brucella*,

Pasteurella, *Providencia*, y *Legionella*. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram-positivas de esta invención incluyen bacterias de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*. Los ejemplos no restrictivos de levaduras y mohos de esta invención incluyen los de los siguientes géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*. Los ejemplos no restrictivos de parásitos de esta invención incluyen a aquellos de los siguientes géneros: *Trypanosoma*, *Babesia*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Wucheria*, *Brugia*, *Onchocerca*, y *Naegleria*. Los ejemplos no restrictivos de Mollicutes de esta invención incluyen a aquellos de los siguientes géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*.

En una realización, como se describe con más detalle aquí, los microorganismos de una muestra o medio de crecimiento pueden ser "separados" o "aislados" y posteriormente escudriñados para caracterizar y/o identificar al microorganismo presente en la muestra. Como se emplea aquí, con el término "separar" se pretende abarcar cualquier muestra de microorganismos que ha sido retirada, concentrada o de otro modo apartada de su estado original, o de un medio de crecimiento o cultivo. Por ejemplo, según esta invención, los microorganismos pueden ser separados (por ej., como una muestra o masa separada de microorganismo) de los no microorganismos o los componentes no microbianos que pueden de otro modo interferir con la caracterización y/o identificación. El término puede incluir una capa de microorganismos recolectados sobre una superficie sólida (por ej., una membrana de un filtro). Como tal, una muestra de microorganismos separada (o masa o película delgada de microorganismos) puede incluir cualquier colección o capa de microorganismos y/o componentes de los mismos que estén más concentrados, o de otro modo más separados, que la muestra original, y puede variar desde un agregado denso y muy compacto de microorganismos hasta una capa difusa de microorganismos. Los componentes microbianos que pueden estar comprendidos en una forma o muestra separada incluyen, pero no se limitan a, pili, flagelos, fimbrias, y cápsulas en cualquier combinación. Los componentes no microbianos que son separados de los microorganismos pueden incluir células no microbianas (por ej., células sanguíneas y/o células tisulares), cilindros o cristales urinarios y/o cualquier componente de los mismos. Como se emplea aquí, con el término "aislado" se pretende abarcar cualquier muestra de microorganismos que han sido al menos parcialmente purificados a partir de su estado original, o fuera de su medio de crecimiento o cultivo, y cualquier no microorganismo o componente no microbiano contenido en la misma. Por ejemplo, según esta invención, los microorganismos pueden ser aislados (por ej., como una muestra aislada) a partir de no microorganismos o componentes no microbianos que de otro modo pueden interferir con la caracterización y/o identificación. Los componentes no microbianos que son separados de los microorganismos pueden incluir células no microbianas (por ej., células sanguíneas y/o células tisulares) y/o cualquier componente de las mismas.

En una realización, como se describe en más detalle aquí, los microorganismos de una muestra o medio de crecimiento pueden ser "acumulados" o "capturados" en o sobre un material filtrante (por ej., una membrana filtrante), y posteriormente escudriñados para caracterizar y/o identificar al microorganismo presente en la muestra. Como se emplea aquí, el término "acumulado" o "capturado" comprende cualquier muestra de microorganismos que se ha comprimido o depositado en una masa o película de microorganismos. Por ejemplo, los microorganismos de una muestra pueden ser comprimidos o depositados en una masa o película sobre un material filtrante (por ej., una membrana filtrante) por filtración. El término incluye una colección de microorganismos (y/o componentes de los mismos) sobre la superficie de un material filtrante (por ej., una membrana filtrante) después de la filtración (por ej., filtración al vacío). Los componentes de microorganismos que pueden estar comprendidos en masa comprimida o depositada de microorganismos incluyen, pero no se limitan a, pili, flagelos, fimbrias, y cápsulas en cualquier combinación. Según esta invención, los microorganismos pueden ser comprimidos o depositados en una masa (por ej., como una masa de microorganismos sustancialmente purificada), fuera de los no microorganismos o componentes no microbianos que pueden de otro modo interferir con la caracterización y/o identificación del microorganismo (por ej., por espectrometría de masas). Los componentes no microbianos que se aíslan o separan de los microorganismos pueden incluir células no microbianas (por ej., células sanguíneas y/o células tisulares) y/o cualquier componente de las mismas.

Como se emplea aquí, la expresión "analizar dicha muestra aislada o acumulada" pretende comprender todos los métodos o medios conocidos para analizar, escudriñar, obtener o adquirir de otro modo mediciones o datos que puedan utilizarse para la caracterización y/o identificación de microorganismos (por ej., microorganismos desconocidos). Por ejemplo, una masa de microorganismos aislada o acumulada puede analizarse o examinarse por métodos espectroscópicos, por ej., en base a características intrínsecas de los microorganismos (por ej., fluorescencia intrínseca) o a la estructura vibracional de las moléculas constituyentes (por ej., espectroscopia Raman). En otra realización, una masa aislada o acumulada de microorganismos puede ser analizada o examinada por métodos de espectrometría de masas (por ej., MALDI-TOF-MS) para obtener mediciones o datos que pueden utilizarse para la caracterización y/o identificación de microorganismos desconocidos, como se describen con más detalle aquí.

La presente invención proporciona métodos para aislar o separar microorganismos, y subsiguientemente caracterizar y/o identificar microorganismos en una muestra. Más aun, el método puede ser particularmente útil para el aislamiento o la separación y la subsiguiente caracterización y/o identificación de microorganismos en muestras complejas, como muestras de orina o medios de cultivo que contienen sangre. Los métodos rápidos también permiten la caracterización y/o identificación de microorganismos más rápidamente que las técnicas anteriores, y

dan como resultado diagnósticos más veloces (por ej., en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene septicemia, meningitis o una infección del tracto urinario) y la caracterización/identificación de materiales contaminados (por ej., alimentos y productos farmacéuticos) o agua. Las etapas comprendidas por los métodos de la invención, desde la obtención de una muestra hasta la caracterización/identificación de los microorganismos, pueden llevarse a cabo en un lapso de tiempo muy corto para obtener información procesable clínicamente relevante. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en menos de aproximadamente 120 minutos, por ej., en menos de aproximadamente 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 minutos. La tremenda rapidez de los métodos de la invención representa una mejora con respecto a los métodos previos. Los métodos pueden utilizarse para caracterizar y/o identificar cualquier microorganismo como el descrito aquí. En una realización, el microorganismo es una bacteria. En otra realización, el microorganismo es una levadura. En aun otra realización, el microorganismo es un moho. En una realización adicional, el microorganismo es un parásito. En otra realización, el microorganismo es un micoplasma. Además, los métodos de la invención pueden ser totalmente automatizados, con lo que se reduce el riesgo de manipular materiales infecciosos y/o contaminar las muestras.

Muestras

Las muestras que pueden someterse a ensayo (es decir, una muestra de ensayo) por los métodos de la invención incluyen muestras tanto clínicas como no clínicas, en donde se sospecha o puede sospecharse la presencia y/o crecimiento de microorganismos, así como también muestras de materiales que son rutinaria u ocasionalmente sometidos a ensayo con respecto a la presencia de microorganismos. La cantidad de muestra utilizada puede variar ampliamente debido a la versatilidad y/o sensibilidad del método. La preparación de la muestra puede llevarse a cabo mediante cualquier número de técnicas conocidas por los expertos aunque una de las ventajas de la presente invención es que los tipos de muestras complejas, como, por ej., sangre, fluidos corporales y/u otras sustancias opacas, pueden someterse a ensayo directamente utilizando el sistema con poco o ningún pretratamiento exhaustivo. En una realización, la muestra se toma a partir de un cultivo. En otra realización, la muestra se toma a partir de un cultivo microbiológico (por ej., un hemocultivo). En otra realización, se sospecha o se sabe que la muestra contiene microorganismos.

Las muestras clínicas que pueden analizarse incluyen cualquier tipo de muestra generalmente analizada en laboratorios clínicos o de investigación, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, plasma, fracciones sanguíneas, fluido articular, orina, semen, saliva, heces, fluido cerebroespinal, contenidos gástricos, secreciones vaginales, secreciones vaginales, homogeneizados tisulares, aspirados de médula ósea, homogeneizados óseos, esputos, aspirados, hisopados y enjuagues de hisopados, otros fluidos corporales, y lo similar. En otra realización, se puede cultivar la muestra clínica, y se puede emplear la muestra del cultivo.

La presente invención resulta útil en la investigación así como en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados de los que pueden obtenerse muestras clínicas son generalmente sujetos mamíferos, pero puede ser cualquier animal. El término "mamífero" como se emplea aquí incluye, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, caballos, gatos, perros, conejos, roedores (por ej., ratas o ratones), etc. Los sujetos humanos incluyen neonatos, niños, jóvenes, adultos y sujetos geriátricos. Los sujetos de los que pueden obtenerse muestras incluyen, sin limitarse a ello, mamíferos, pájaros, reptiles, anfibios y peces.

Las muestras no clínicas que pueden analizarse también incluyen sustancias, que comprenden, pero no se limitan a, productos alimenticios, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, agua (por ej., agua potable, agua no potable, y agua residual), lastres de agua marina, aire, suelo, aguas cloacales, material vegetal (por ej., semillas, hojas, tallos, raíces, flores, frutos), productos sanguíneos (por ej., plaquetas, suero, plasma, fracciones de glóbulos blancos, etc.), muestras de órganos o tejidos de donantes, muestras de armas bacteriológicas, y similares. El método es también particularmente muy adecuado para ensayos en tiempo real para supervisar los niveles de contaminación, control de procesos, control de calidad, y lo similar en instalaciones industriales. En otra realización, se puede cultivar la muestra no clínica, y se puede emplear una muestra de cultivo.

En una realización de la invención, se obtienen muestras de un sujeto (por ej., un paciente) que tiene o se sospecha que tiene una infección microbiana. En una realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene septicemia, por ej., bacteriemia o fungemia. La muestra puede ser una muestra de sangre obtenida directamente del sujeto. La muestra puede ser obtenida a partir de un hemocultivo desarrollado a partir de una muestra de sangre del paciente, por ej., un hemocultivo BacT/ALERT®. La muestra de hemocultivo puede obtenerse a partir de un hemocultivo positivo, por ej., un hemocultivo que indica la presencia de un microorganismo. En ciertas realizaciones, la muestra se toma a partir de un hemocultivo positivo poco tiempo después de que aparezca como positivo, por ej., dentro de aproximadamente 6 horas, por ej., dentro de aproximadamente 5, 4, 3, o 2 horas, o dentro de aproximadamente 60 minutos, por ej., aproximadamente 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 minutos. En una realización, la muestra se toma a partir de un cultivo en donde los microorganismos están en crecimiento en fase logarítmica. En otra realización, la muestra se toma a partir de un cultivo en donde los microorganismos están en una fase estacionaria.

En alguna realización, para asistir a la recuperación de microorganismos adherentes, por ej., a partir de partículas adsorbentes, pueden emplearse las etapas de pretratamiento bien conocidas para muestras que contienen adsorbentes. Por ejemplo, puede agregarse un tensioactivo (por ej., Tween 80) y la muestra puede agitarse en

vórtice. En otras realizaciones, la muestra puede también someterse a sonicación para romper las biopelículas y liberar los microorganismos intactos. Los ejemplos incluyen *S. aureus* unido a partículas de carbón vegetal.

El volumen de la muestra debería ser suficientemente grande para producir una muestra aislada y/o acumulada de microorganismos o una masa de microorganismos que se puede analizar y examinar para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dicho microorganismo después de llevar a cabo la etapa de separación/aislamiento de los métodos de la invención. Los volúmenes adecuados dependerán de la fuente de la muestra y el nivel anticipado de microorganismos en la muestra. Por ejemplo, un hemocultivo positivo contendrá un nivel más alto de microorganismos por volumen que una muestra de agua potable a ser examinada con respecto a contaminación, de modo que puede ser necesario un volumen menor de medio de hemocultivo cuando se compara con la muestra de agua potable. En general, el tamaño de muestra puede ser menor a aproximadamente 50 ml, por ej., menor a aproximadamente 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, o 2 ml. En ciertas realizaciones, el tamaño de muestra puede ser de aproximadamente 1 ml, por ej., aproximadamente 0,75, 0,5, o 0,25 ml. En ciertas realizaciones en donde la separación se realiza a microescala, el tamaño de muestra puede ser menor a aproximadamente 200 μ l, por ej., menor a aproximadamente 150, 100, 50, 25, 20, 15, 10, o 5 μ l. En algunas realizaciones (por ej., cuando se espera que la muestra comprenda un número pequeño de microorganismos), el tamaño de muestra puede ser de aproximadamente 100 ml o más, por ej., aproximadamente 250, 500, 750, o 1000 ml o más.

Etapas de lisis opcional

En algunas realizaciones, después de obtener una muestra, la próxima etapa en el método de la presente invención es lisar o disolver selectivamente las células y/o material en partículas no deseados que pueden estar presentes en la muestra, por ej., células sanguíneas y/o células tisulares. Las células y/o material en partículas pueden ser lisados o disueltos para permitir la separación y/o aislamiento de microorganismos de otros componentes de la muestra. La separación y/o aislamiento de microorganismos de otros componentes impide la interferencia durante la etapa de análisis o escudriñamiento. Si no se espera que haya células no microbianas presentes en la muestra o no se espera que interfieran con la etapa de examen, la etapa de lisis puede no ser necesaria. En una realización, las células a ser lisadas son células no microbianas que están presentes en la muestra. Típicamente, las células no microbianas que pueden estar presentes en la muestra son lisadas. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser deseable la lisis selectiva de clases específicas de microorganismos y, por lo tanto, puede realizarse según los métodos descritos aquí y que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede lisar selectivamente una clase de microorganismos no deseados, por ej., las levaduras son lisadas mientras que las bacterias no lo son o viceversa. En otra realización, los microorganismos deseados son lisados a fin de separar un componente subcelular particular de los microorganismos, por ej., membranas de células u orgánulos. En una realización, la totalidad de las células no microbianas son lisadas. En otras realizaciones, una porción de las células no microbianas son lisadas, por ej., células suficientes para impedir la interferencia con la etapa de escudriñamiento. La lisis de células puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica efectivo para lisar selectivamente células con o sin lisis de microorganismos, incluyendo, sin limitación, la adición de una solución de lisis, sonicación, choque osmótico, tratamiento químico, y/o una combinación de los mismos.

Una solución de lisis es aquella capaz de lisar células, por ej., células no microbianas (por ej., solubilizando o disolviendo membranas de células eucarióticas) y/o células microbianas. En una realización, la solución de lisis puede comprender uno o más detergentes, opcionalmente una o más enzimas, o una combinación de uno o más detergentes y una o más enzimas, y puede además incluir agentes adicionales. En una realización, el detergente puede ser un detergente lítico no desnaturalizante, como Triton® X-100, Triton® X-100-R, Triton® X-114, NP-40, Genapol® C-100, Genapol® X-100, Igepal® CA 630, Arlasolve™ 200, Brij® 96/97, CHAPS, octil- β -D-glucopiranosido, saponina, y nonaetilenglicol-monododecil-éter (C12E9, polidocanol). Opcionalmente, pueden incluirse detergentes líticos desnaturalizantes, como dodecilsulfato sódico, N-laurilsacosina, desoxicolato sódico, sales biliares, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, SB3-10, SB3-12, amidosulfobetaina-14, y C7BzO. Opcionalmente, pueden incluirse solubilizantes, como Brij® 98, Brij® 58, Brij® 35, Tween® 80, Tween® 20, Pluronic® L64, Pluronic® P84, sulfobetainas no detergentes (NDSB 201), anfipoles (PMAL-C8), y metil- β -ciclodextrina. Típicamente, se utilizan detergentes no desnaturalizantes y solubilizantes a concentraciones por encima de su concentración micelar crítica (CMC), mientras que los detergentes desnaturalizantes pueden agregarse a concentraciones por debajo de su CMC. Por ejemplo, pueden emplearse detergentes líticos no desnaturalizantes a una concentración de aproximadamente 0,010% a aproximadamente 10%, por ej., de aproximadamente 0,015% a aproximadamente 1,0%, por ej., de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%, por ej., de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,30% (concentración final después de dilución con la muestra). En otra realización, pueden preferirse los detergentes que comprenden un grupo "cabeza" de polioxietileno hidrófilo unido a un grupo "cola" de alcano o alqueno hidrófobo mediante un enlace de éter. Estos detergentes son comúnmente especificados por la notación C_xE_y , en donde "x" es igual al número de carbonos en la cadena de alcano o alqueno, mientras que "y" es el número de monómeros de oxietileno (CH_2CH_2O) en la cadena de polioxietileno. Se prefieren los detergentes de este tipo en donde x se encuentra dentro del intervalo de 10-20 e y se encuentra dentro del intervalo de 8-12. Se prefieren aún más los detergentes de este tipo en donde x se encuentra dentro del intervalo de 12-18 e y se encuentra dentro del intervalo de 9-11. Por ejemplo, el detergente de alcano-polioxietileno o de alquenopolioxietileno puede seleccionarse del grupo que consiste en Brij® 97, Brij® 96V, Genapol® C-100, Genapol® X-100, nonaetileno-glicol-monododecil éter (polidocanol), o una combinación de los mismos.

Las enzimas que pueden utilizarse en las soluciones de lisis incluyen, sin limitación, las enzimas que digieren ácidos nucleicos y otros materiales que obstruyen las membranas (por ej., proteinasa, DNasa, neuraminidasa, polisacaridasa, Glucanex®, y Pectinex®). Otros aditivos que pueden emplearse incluyen, sin limitación, agentes reductores como 2-mercaptoetanol (2-Me) o ditioneitol (DTT) y agentes estabilizantes como magnesio, piruvato, y humectantes. La solución de lisis puede ser tamponada a cualquier pH que sea adecuado para lisar las células deseadas, y dependerá de múltiples factores, incluyendo, sin limitación, el tipo de muestra, las células a ser lisadas, y el detergente empleado. En algunas realizaciones, el pH puede mantenerse en un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 13, por ej., de aproximadamente 6 a aproximadamente 13, por ej., de aproximadamente 8 a aproximadamente 13, por ej., de aproximadamente 10 a aproximadamente 13. Los tampones de pH adecuados incluyen cualquier tampón capaz de mantener un pH en el intervalo deseado, por ej., CAPS de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 1,0 M. Para algunos tipos de muestras (por ej., orina), el pH óptimo para la disolución de células y/o material en partículas no deseadas puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 8.

En una realización, la muestra y la solución de lisis se mezclan y después se incuban durante un tiempo suficiente para que se produzcan la lisis y la solubilización de las membranas celulares, por ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, o 60 segundos, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o 20 minutos o más, por ej., de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 minutos. En otra realización, la muestra y la solución de lisis se incuban de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 minutos. El tiempo de incubación dependerá de la fuerza de la solución de lisis por ej., la concentración del detergente y/o las enzimas. En general, los tampones de lisis más suaves requerirán más tiempo y una mayor dilución de la muestra para solubilizar completamente las células no microbianas. La fuerza de la solución de lisis puede seleccionarse en función de los microorganismos que se sabe o se sospecha que se encuentran en la mezcla. Para los microorganismos que son más susceptibles a la lisis, puede utilizarse una solución de lisis suave. La lisis puede tener lugar a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C.

En algunas realizaciones, las condiciones de la lisis (por ej., la disolución o el tiempo de incubación), así como también las etapas de separación y/o escudriñamiento, pueden ser suficientes para matar algunos o todos los microorganismos en la muestra. Los métodos de la presente invención son muy versátiles y no requieren que todos los microorganismos estén vivos para que se produzcan el aislamiento y la identificación. En ciertas realizaciones, algunos o todos los microorganismos pueden estar muertos, ocurriendo la muerte antes, durante y/o después de las etapas de los métodos que se están llevando a cabo.

Otros detalles y la descripción de los tampones de lisis contemplados en la práctica de esta invención se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/589.929 (actualmente publicada como US 2010/0129857 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Isolation and Identification of Microorganisms". Otros detalles y la descripción de los tampones de lisis contemplados pueden encontrarse en la solicitud de patente de EE.UU. en trámite N° de serie 12/589.936 (actualmente publicada como US 2010/0120085 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Mass Spectrometry".

Típicamente, en la práctica de esta invención, la etapa de lisis se lleva a cabo dentro de un recipiente (por ej., un tubo de microcentrífuga). El recipiente puede ser cualquier recipiente con volumen suficiente para contener una muestra de ensayo y opcionalmente una solución de lisis. El recipiente puede ser un tubo de microcentrífuga. En la práctica de esta invención se puede emplear el dispositivo de separación dado a conocer en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/589.969 (actualmente publicada como US 2010/0120133 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms". El volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 25 ml, por ej., aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, por ej., aproximadamente 2 ml a aproximadamente 8 ml. Si la etapa de lisis y la subsiguiente etapa de aislamiento o separación se realizan a microescala, el volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 2 µl a aproximadamente 100 µl, por ej., aproximadamente 5 µl a aproximadamente 50 µl. El recipiente puede tener un dispositivo de cierre fijado o puede estar roscado para aceptar un dispositivo de cierre (por ej., una tapa) para que el recipiente pueda estar herméticamente sellado durante su uso. La presencia de un cierre reduce los riesgos de manipulación de microorganismos que sean o puedan ser infecciosos y/o peligrosos, así como el riesgo de contaminar la muestra. Además, otra posible ventaja de los métodos de la presente invención es la capacidad de llevar a cabo una o más de las etapas (por ej., las etapas de lisis o filtración) con los microorganismos en un recipiente sellado (por ej., un recipiente herméticamente sellado). Los presentes métodos pueden evitar los riesgos para la salud y la seguridad asociados con la manipulación de microorganismos muy virulentos, como ocurre con la recuperación de microorganismos a partir de muestras para ensayo directo.

Dispositivos de filtración y transferencia de muestra

Como se describe anteriormente, la presente invención también se refiere a un dispositivo de filtración y transferencia de muestra que funciona para la separación, captura y acumulación de microorganismos de una

muestra de ensayo mediante filtración al vacío, y la subsiguiente transferencia de los microorganismos capturados y acumulados (por ej., como una masa o una película) a un portaobjetos o placa de ensayo para el análisis o escudriñamiento de los microorganismos (por ej., por espectrometría de masas). En una realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra comprende un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que tiene un cuerpo alargado y hueco (por ej., un tubo alargado y hueco cilíndrico, hexagonal o de forma similar,) que tiene un primer extremo o punta que está provisto de o tapado con un material de filtración (por ej., una membrana de filtración), en donde dicho material de filtración está en posición adyacente a y sobresale de dicho primer extremo o punta, en donde dicho cuerpo hueco alargado está lleno de, o taponado con, un adsorbente para proporcionar soporte al material de filtración, y un segundo extremo adaptado para conexión con un sistema o dispositivo de vacío. Por ejemplo, el material de filtración puede ser externo con respecto al primer extremo o punta del cuerpo alargado (es decir, se extiende sobre o sobresale del mismo). Los presentes solicitantes han encontrado que el uso de un material de filtración que se extiende sobre o sobresale del primer extremo del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado permite la transferencia de cualquiera de los microorganismos aislados y/o acumulados, por ej., mediante frotación o manchado de una placa o portaobjetos con la muestra.

En una realización, el cuerpo hueco y alargado es de vidrio. En otra realización, el cuerpo hueco y alargado es de un material plástico rígido o semi-rígido, como polipropileno (PP), policarbonato (PC), tereftalato de polietileno (PET), u otro material plástico. En general, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado comprende un cuerpo alargado y generalmente cilíndrico cuyo diámetro de la punta de filtración es de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 10 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm, o de aproximadamente 1,5 mm a aproximadamente 3 mm. En otra realización, el cuerpo del cilindro puede ensancharse hasta un diámetro aun mayor para poder contener un volumen mayor de material filtrado. El dispositivo de filtración y transferencia puede tener una longitud de 2 cm a aproximadamente 20 cm, de aproximadamente 3 cm a aproximadamente 15 cm, o de aproximadamente 4 cm a aproximadamente 10 cm. En una realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado comprende un cuerpo cilíndrico alargado que tiene un diámetro de aproximadamente 1,5 mm a aproximadamente 3 mm, y una longitud de aproximadamente 4 cm a aproximadamente 10 cm. En otra realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado comprende un cuerpo cilíndrico alargado que tiene un volumen interno de aproximadamente 0,5 cm³ a aproximadamente 10 cm³, de aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 5 cm³, o de aproximadamente 1,5 cm³ a aproximadamente 3,5 cm³. En otra realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado comprende un cuerpo cilíndrico alargado que tiene un diámetro de aproximadamente 1,5 mm a aproximadamente 3 mm y una longitud de aproximadamente 4 cm a aproximadamente 10 cm (o un volumen de aproximadamente 0,9 cm³ a aproximadamente 4,7 cm³).

En una realización, el tubo cilíndrico, alargado y hueco del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado puede llenarse o compactarse con un adsorbente. La concentración de un material adsorbente detrás de la membrana es útil de dos maneras. Primero, proporciona soporte, lo que permite que la membrana sobresalga levemente más allá de la punta, habiendo encontrado los solicitantes que esto permite una transferencia de microorganismos más eficaz desde el material de filtro (por ej., una membrana de filtro) hasta un portaobjetos o placa objetivo. Segundo, el uso de un adsorbente en el dispositivo de filtración y transferencia también permite la adsorción del lisado (es decir, materiales de medio y/o células de cultivo) que ha pasado a través del material de filtración. Más aún, los solicitantes han descubierto que el material taponante proporciona una clara zona de separación entre el lisado de la muestra y la membrana filtrante, lo que impide el retromezclado del filtrado del lisado en contacto con la membrana durante y después del lavado, impidiendo así la recontaminación de los microbios limpios. En general, puede emplearse cualquier material. Por ejemplo, en una realización, el adsorbente puede ser un material de poliéster, vidrio o celulosa en forma de fibras o de partículas. En otra realización, el adsorbente podría ser una resina adsorbente, un gel de sílice, un hidrogel, derivados de ácido poliacrílico o de poliacrilamida, gomas vegetales, un tamiz molecular, zeolita u otros adsorbentes bien conocidos por los expertos en la técnica.

Según la presente invención, el primer extremo o punta del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado está provisto de, o tapado con, un material filtrante (o material de filtración). Por ejemplo, como se describe anteriormente aquí, el material de filtración (por ej., una membrana filtrante) es adyacente a, y se extiende desde, el primer extremo o punta del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado. En general, en la práctica de la invención puede emplearse cualquier material filtrante con tamaños de poros que retienen al menos algunas porciones de los microorganismos y permiten que el lisado pase a través de los mismos. Los materiales de filtro empleados en la práctica de esta invención pueden comprender membranas filtrantes o filtros de profundidad muy conocidos en la técnica. En una realización, la membrana filtrante tendrá un tamaño de poros de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 30,0 µm, o de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 10,0 µm, o de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 1,0 µm. Los ejemplos de membranas pueden incluir, membranas de poliétersulfona (PES) (por ej., Supor® 200, Supor® 450, Supor® MachV (Pall-Gelman, Port Washington, NY), Millipore Express PLUS® (Millipore)). Otros materiales filtrantes posibles pueden incluir, HT Tuffryn® (polisulfona), GN Metricel® (éster de celulosa mixto), Nylaflo® (Nailon), FP Verticel (PVDF), todos de PallGelman (Port Washington, NY), y Nuclepore (policarbonato) de Whatman (Kent, UK). Los ejemplos de materiales filtrantes de profundidad pueden incluir, tipo GF/F, GF/C y GMF150 (fibra de vidrio, Whatman), Metrigard® (fibra de vidrio, Pall-Gelman), AP15 (fibra de vidrio, Millipore), así como también una variedad de filtros de celulosa, poliéster, polipropileno u otros filtros de fibra o material en partículas, siempre que el medio filtrante pueda retener una

cantidad suficiente de los microorganismos objetivo para permitir el análisis. En otra realización, puede emplearse un material filtrante formado por fibras o partículas modificado, por ejemplo, una membrana con potencial zeta.

5 Como se describió anteriormente, el segundo extremo del tubo hueco alargado, opuesto al primer extremo o punta del tubo hueco alargado, puede fijarse a una fuente de vacío o sistema de vacío, que funciona para proporcionar un vacío para la filtración (es decir, para la filtración al vacío). En general, puede emplearse cualquier medio conocido en la técnica para conectar el dispositivo de filtración y transferencia de muestra al sistema de vacío. Por ejemplo, el dispositivo de filtración y transferencia puede conectarse a un sistema de vacío con el uso de un tubo al vacío simple, como es bien conocido en la técnica.

10 En otra realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra puede comprender además un bulbo de compresión para aplicación manual de un vacío para filtración al vacío. El uso del bulbo de compresión puede también permitir el uso de una técnica de flujo inverso para transferir una cantidad suficiente de microbios a un portaobjetos o placa para el análisis por espectrometría de masas, como se describe aquí. En otra realización, puede emplearse una jeringa y un émbolo para generar un vacío. En aun otra realización, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado puede utilizar el tapón interno de adsorbente para proporcionar suficiente acción capilar y/o fuerza de absorción para la filtración y el lavado (es decir, para permitir así la filtración pasiva).

15 Con referencia ahora a la Figura 1, se muestra un ejemplo de realización del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado. La Figura 1 ilustra un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 2 que comprende un cuerpo o tubo cilíndrico hueco y alargado 4 que tiene un primer extremo o punta 6 y un segundo extremo 8. El primer extremo o punta 6 está provisto de, o tapado con, un filtro o material de filtración 9, que funciona para capturar o acumular microorganismos cuando se aplica vacío o succión al dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 2. En la presente invención el material de filtración 9 es adyacente y externo al (es decir, se extiende sobre o sobresale del) primer extremo o punta 6 del cuerpo o tubo cilíndrico y alargado 4. El segundo extremo 8 está generalmente conectado a una fuente o un sistema de vacío (no se muestra). En otras realizaciones, el segundo extremo 8 puede proporcionarse con un bulbo o un émbolo para proveer una fuerza de succión o flujo de fluidos para la filtración. Como se muestra, en una realización posible, el cuerpo de forma cilíndrica y hueco puede llenarse o compactarse con un adsorbente 10, como se describió anteriormente. Según esta realización, el mismo adsorbente puede proporcionar una acción capilar o fuerza absorbente que provee el flujo de fluidos para la filtración.

20 Otro concepto de diseño se ejemplifica en las Figuras 2-3. Las Figuras 2-3, ilustran un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 12 que comprende un tubo o cuerpo cilíndrico, alargado y hueco 14 que tiene un primer extremo 15 y un segundo extremo 16. El primer extremo 15 está provisto de, o tapado con, un material filtrante 17, que funciona para capturar o acumular microorganismos cuando se aplica vacío o succión al dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 12. En la invención, el material de filtración 17 es adyacente, y externo al primer extremo o punta 15 del tubo o cuerpo cilíndrico alargado 14 (es decir, se extiende sobre o sobresale del mismo). El primer extremo 15 del dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 12 puede además comprender una porción ahusada 18 y una punta ensanchada o aplanada 19. En otras realizaciones, el segundo extremo 16 puede proporcionarse con un bulbo o un émbolo para proporcionar una fuerza de succión para la filtración. Como también se muestra, en una realización posible, el cuerpo cilíndrico y hueco puede llenarse o compactarse con un adsorbente 10, como se describe anteriormente. Según esta realización, el mismo adsorbente puede proporcionar una acción capilar o fuerza absorbente que provee el flujo de fluidos para la filtración.

30 En otra realización, la presente invención proporciona una unidad de filtración y transferencia de muestra que comprende una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados para el aislamiento y/o la acumulación de una pluralidad de muestras de ensayo y para la transferencia simultánea de microorganismos aislados y/o acumulados a un recipiente, portaobjetos o placa para analizar dicha muestra aislada o acumulada de dichos microorganismos a fin de obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dichos microorganismos. Este dispositivo se ejemplifica en las Figuras 4-5.

35 Como se muestra en las Figuras 4-5, la unidad de filtración y transferencia de muestra 20 comprende una placa base 22, una placa superior 24 y un par de varillas de apoyo verticales 26 ubicadas entre la placa superior 24 y dicha placa base 22 y separando las mismas. La placa superior 24 además comprende un par de rodillos 28 que permiten que la placa superior se mueva "hacia arriba" y "hacia abajo" en un plano vertical a lo largo de las varillas de soporte 26.

40 Como se muestra, la unidad de filtración y transferencia de muestra 20 puede además comprender un par de rieles base 30 y las correspondientes varillas guía 32 de la gradilla, que sostienen una gradilla 34 que tiene una pluralidad de pocillos 36 para contener una pluralidad de tubos individuales 38 (por ej., tubos de microcentrífuga). Como se muestra, los rieles base 30 pueden comprender ranuras 40 que sostienen las varillas guía 32 de la gradilla y permiten que las varillas guía de la gradilla 34 se deslicen en un plano horizontal con respecto a la placa base 22 y a los rieles de base 28. Como también se muestra, la gradilla 34 puede comprender una manivela 42 que permite al usuario o técnico deslizar la gradilla 34 hacia atrás y hacia adelante en un plano horizontal, según es guiado por las ranuras 40, a lo largo de los rieles base 30.

Además, como se muestra en las Figuras 4-5, la unidad de filtración y transferencia de muestra 20 puede además comprender un brazo de eje vertical 44 y una plataforma vertical 46, que permite que el soporte de eje vertical 44 se mueva “hacia arriba” y “hacia abajo” (es decir, en un plano vertical) junto con la plataforma vertical 46. Este movimiento vertical permite que la placa superior se mueva “hacia arriba” y “hacia abajo” (es decir, verticalmente) junto con las varillas de soporte 26.

La placa superior 24 sostiene una unidad de vacío 50 que sostiene a una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados 52. Como se muestra en las Figuras 4-5, la unidad de vacío 50 puede también comprender una barra de alineamiento orientada horizontalmente 54 que comprende una pluralidad de lugares o pocillos 56 separados por espacios iguales para contener una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados extraíbles 52. Como se muestra, en una realización, la barra de alineamiento 54 contiene o sostiene una pluralidad de (por ej., doce (12)) dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados 52. Como se muestra, pueden emplearse uno o más puntos de separación (por ej., cuatro (4)) 58 para separar o sostener la barra de alineamiento 54 desde la placa superior 24.

La unidad de vacío 50 además incluye un colector de válvulas 60 que comprende una pluralidad de válvulas 62 y conectores 64 en donde cada uno individualmente sostiene y conecta un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado 52 a la unidad de vacío 50. Cada válvula individual 62 y conector 64 sostenido sobre el colector de válvulas 60 se conecta individualmente a un colector de vacío 66 mediante tubos de vacío individuales 68. El colector de vacío 66 se conecta a un sistema al vacío (no se muestra) a través del principal tubo de vacío 70.

En funcionamiento, se proporciona un vacío a cada uno de los dispositivos individuales de filtración y transferencia de muestra integrados 52 a partir de una fuente de vacío (no se muestra) por un canal de vacío. El canal de vacío comprende, en serie a partir de la fuente de vacío, el tubo de vacío principal 70 y el colector de vacío 66. A partir del colector de vacío 66, el canal de vacío conecta a y suministra un vacío a los canales de vacío individuales, en donde cada canal de vacío individual comprende, en serie desde la fuente de vacío, los tubos de vacío individuales 68, válvulas 62, el colector de válvulas 60, los conectores 64, y finalmente cada dispositivo individual de filtración y transferencia de muestra integrado 52.

La presente también describe, aunque sin formar parte de la invención reivindicada, un sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes. El sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes comprende una primera parte, o una unidad de filtración, para el aislamiento y/o la acumulación de una pluralidad de muestras de ensayo (es decir, muestras de ensayo que contienen o que se sospecha que contienen microorganismos) mediante filtración, y una segunda parte, o unidad de transferencia, para la transferencia simultánea de la pluralidad de muestras de microorganismos aislados y/o acumulados a un portaobjetos o una placa para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dichos microorganismos. Este dispositivo se ejemplifica en las Figuras 6-9.

El sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes 100 puede comprender una primera parte, o una unidad de filtración 102 (ver, por ej., la Figura 6), y una segunda parte, o unidad de transferencia 104 (ver, por ej., la Figura 9D). Como se muestra en las Figuras 6-12, el sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes 100 puede comprender una unidad de filtración 102 de 48 pocillos (Figura 6) y que corresponden a la unidad de transferencia 104 (Figura 9D) para transferir hasta 48 muestras filtradas (es decir, masas de microorganismos aislados y/o acumulados) a un portaobjetos o placa de 48 pocillos (por ej., una placa de 48 pocillos MALDI-TOF) para el análisis y la subsiguiente caracterización y/o identificación de hasta 48 muestras de ensayo individuales (es decir, 48 masas individuales de microorganismos aislados y/o acumulados). Como apreciará un experto en la técnica, otras configuraciones de pocillos son posibles.

Como se muestra en las Figuras 6-8, la unidad de filtración 102 comprende una placa base de vacío 106, un bloque de junta inferior 108 y un bloque superior 110. La placa base 106 comprende un conector de vacío 120 para fijar un conductor de vacío (por ej., un tubo de vacío) para proporcionar un vacío al sistema de filtración y transferencia de muestra de dos partes 100 a partir de una fuente de vacío (no se muestra). La unidad de filtración 102 además comprende una pluralidad de pernos extraíbles 112 y orificios pasantes de los pernos 114 que se proveen a través de una placa base de vacío 106, un bloque de junta inferior 108 y un bloque superior 110. Los pernos 112 y los orificios pasantes de los pernos 114 permiten que se asegure o se ensamble la unidad de filtración 102 antes o durante la filtración. La unidad de filtración 102 también comprende un par de pasadores de alineamiento 116 y orificios pasantes de alineamiento 118 que permiten el ensamblado de la unidad de filtración 102 antes de asegurar o ensamblar la unidad 102 vía los pernos 112. Como se muestra en la Figura 6, los orificios pasantes de alineamiento 118, al igual que los orificios pasantes de los pernos 114, también se proporcionan a través de la placa base de vacío 106, un bloque de junta inferior 108 y un bloque superior 110.

La unidad de filtración 102 además comprende una junta de vacío 122 que proporciona un sello hermético entre la placa base de vacío 106 y el bloque de junta inferior 108.

Como se muestra en la Figura 6, el bloque de junta inferior 108 contiene una cavidad de filtración 124 que comprende un espacio en la superficie superior del bloque de junta inferior 108 y contiene allí una pluralidad de orificios pasantes de filtración 140. La cavidad de filtración 124 aloja una junta más baja 128 y una junta más alta

130, que encierran en forma de "sandwich" a un material filtrante 132 (por ej., una membrana filtrante). Como la cavidad al vacío 124, las juntas más baja 128 y más alta 130 comprenden allí una pluralidad de orificios pasantes de filtración 140, que corresponden a los orificios pasantes de filtración contenidos en la cavidad de filtración 124. Como se ejemplifica en la Figura 6, la cavidad de filtración 124, la junta inferior 128 y la junta superior 130 pueden comprender 48 orificios pasantes en vacío 140 correspondientes (nuevamente otras configuraciones de orificios de muestra son posibles y se contemplan como parte de la presente invención). Las juntas inferior 128 y superior 130 proporcionan un sello hermético que permite la filtración a través del material filtrante en respuesta al vacío que se toma vía el conector de vacío 120 y la fuente de vacío (no se muestra).

El bloque superior 110 puede además comprender una junta o cinta intermedia 136 y una placa superior 138, como se muestra por ejemplo en la Figura 6. Como la cavidad de filtración 124, la junta inferior 128 y la junta superior 130, el bloque superior 110, la junta o cinta intermedia 136 y una placa superior 138 comprenden una pluralidad de orificios o pocillos de muestras 142, en los que una muestra de ensayo puede ser agregada y filtrada para aislamiento y/o acumulación de cualquiera de los microorganismos contenidos en la misma. Cada uno entre la pluralidad de orificios o pocillos de muestra 142 corresponden a, o se alinean con, cada uno de los orificios pasantes en vacío 140 contenidos en la cavidad de filtración 124, junta inferior 128 y junta superior 130. Usando una junta o cinta intermedia 136, el bloque superior 110 y la placa superior 138 pueden formarse en dos partes separadas y después ensamblarse con la cinta o junta intermedia 136, lo que permite que se formen canales cóncavos de flujo de fluidos (como se muestra en las Figuras 10-12) en cada parte.

Como se muestra en la Figura 10, la superficie inferior 180 de la placa superior 138 puede comprender un primer canal de flujo de fluidos 182. El primer canal de flujo de fluidos 182 ilustrado en las Figuras 10 y 12 comprende una entrada 184 ubicada en un borde lateral de la placa superior 138 y una pluralidad de canales de distribución 186 que proporcionan comunicación fluida entre la entrada 184 y una pluralidad de orificios o pocillos de muestra individuales 142 en la placa superior 138. Como se muestra más claramente en la Figura 12, el primer canal de flujo de fluidos 182 lleva un flujo de fluidos, desde la entrada 184 hasta el borde superior de los orificios o pocillos de muestra individuales 142 formados por el bloque superior 110, la junta o cinta intermedia 136 y una placa superior 138. Puede emplearse el primer canal de flujo de fluidos 182 para proporcionar una muestra líquida a los orificios o pocillos de muestra individuales, por ejemplo, los pocillos de muestra individuales 142 puede llenarse con una solución lítica o un tampón de lavado vía el primer canal de flujo de fluidos 182 (como se muestra, por ejemplo, mediante la flecha 188).

Como se muestra en la Figura 11, la superficie superior 190 del bloque superior 110 puede comprender un segundo canal de flujo de fluidos 192. El segundo canal de flujo de fluidos ilustrado en las Figuras 11-12 comprende una pluralidad de canales de salida 194 que llevan desde o conectan la parte inferior de la pluralidad de orificios o pocillos de muestra individuales 142 hasta una pluralidad de canales de distribución 196 contenidos en la superficie superior 190 del bloque superior 110, que a su vez llevan a una puerta de salida 198 contenida en un borde lateral del bloque superior 110. El segundo canal de flujo de fluidos 192 puede emplearse para retirar fluido desde los pocillos de muestra individuales 142 (como se muestra, por ejemplo, mediante la flecha 200). Por ejemplo, si uno o más de los pocillos son bloqueados u obstruidos debido a la acumulación de microorganismos en el material filtrante, la fuente de vacío puede desconectarse, y se puede suministrar un segundo medio (por ej., un segundo vacío) para proveer fuerza o succión para extraer el exceso de fluido de los pocillos de muestra individuales 142 vía el segundo canal de flujo de fluidos 192.

En funcionamiento, puede filtrarse una pluralidad de muestras de ensayo (por ej., muestras de hemocultivo lisadas, según una realización posible de la presente invención) a través de la unidad de filtración 102, y el microorganismo contenido en las mismas puede ser aislado y/o acumulado en el material filtrante 132. Según esta disposición, puede agregarse una muestra de ensayo individual (no se muestra) a un pocillo de muestra individual 142 y puede aplicarse un vacío a la unidad de filtración 102 a partir de una fuente de vacío (no se muestra) vía el conector de vacío 120 para la filtración del material lisado a través del material filtrante 132, con lo que se aíslan y/o acumulan cualquiera de los microorganismos en el material filtrante 132. Este procedimiento puede repetirse con muestras de ensayo diferentes en cada uno de los orificios o pocillos de muestra individuales 142 provistos en el bloque superior 110.

Como se muestra en las Figuras 9A-9D, la unidad de transferencia 104 comprende un bloque de pasadores de transferencia 150 que comprende una base 152, un par de pasadores de alineamiento 154 y una pluralidad de pasadores de transferencia 156. Según esta disposición, los pasadores de transferencia 156 funcionan para transferir una masa de microorganismos aislados y/o acumulados a un portaobjetos o placa 160 (por ej., una placa de MALDI-TOF) al presionar el material filtrante (por ej., una membrana filtrante) firmemente contra el portaobjetos o placa 160, y de esta manera transferir los microorganismos aislados y/o acumulados.

La transferencia de los microorganismos aislados y/o acumulados a un portaobjetos o placa 160 se ilustra en las Figuras 9A-9D. En funcionamiento, después de la filtración, el bloque de junta inferior 108 es retirado de la unidad de filtración 102. La junta superior 130 es retirada de la cavidad de vacío 124 del bloque de junta inferior 108 y se coloca un portaobjetos o placa 160 (por ej., una placa de MALDI-TOF) en la cavidad de vacío sobre la parte superior del material filtrante 132 (ver las Figuras 9A y 9B). Para proporcionar el lugar exacto del portaobjetos o la placa 160 en la cavidad de vacío 124, se proveen una guía 162 y un reborde 164 sobre la superficie superior del bloque de

5 junta inferior 108. El alineamiento del portaobjetos o placa 160 con la guía 162 y el reborde 164 asegura que los manchados de muestra 166 contenidos sobre la superficie del portaobjetos o placa 160 estén correctamente alineados con los manchados de microorganismos correspondientes (no se muestran) que resultan de la filtración de muestras de ensayo individuales a través de los orificios o pocillos de muestra individuales 142 provistos en el bloque superior 110 (es decir, cada uno de los orificios o pocillos de muestra individuales 142 se alinea con un manchado de muestra correspondiente 166).

10 A continuación, el bloque de junta inferior 108, el material filtrante 132 y el portaobjetos o placa 160, se transfieren a y se alinean con la parte superior del bloque de pasadores de transferencia 150 utilizando los pasadores de alineamiento 154 y los orificios pasantes de alineamiento 118 provistos en el bloque de junta inferior 108 (ver la Figura 9C). Los pasadores de alineamiento 154 y los orificios pasantes de alineamiento 118 permiten que los pasadores de transferencia 156 se alineen correctamente con los orificios pasantes 140 contenidos en el bloque de junta inferior 108, y así permitan el alineamiento adecuado, en serie, de los pasadores de transferencia, los microorganismos aislados y/o acumulados en el material filtrante 132 y los correspondientes manchados de muestra 166 contenidos sobre la superficie del portaobjetos o placa 160.

15 Finalmente, los pasadores de transferencia 156 pueden ser presionados dentro del material filtrante 132 y el portaobjetos o placa 160, con los medios conocidos en la técnica, para transferir los microorganismos aislados y/o acumulados (resultan de la filtración de muestras de ensayo individuales a través de uno o más de los correspondientes orificios o pocillos de muestra individuales 142) a los correspondientes puntos de muestra 166 contenidos sobre la superficie del portaobjetos o placa 160 (ver Figura 9D). Subsiguientemente, el portaobjetos o la placa 160 pueden analizarse o examinarse para obtener mediciones con respecto a la caracterización y/o identificación de dichos microorganismos.

Etapa de separación, aislamiento y/o acumulación

25 La siguiente etapa en el método de la presente invención (por ej., la etapa después de lisar la muestra, si se realiza una etapa de lisado o disolución) es una etapa de separación, aislamiento y/o acumulación. La etapa de separación, aislamiento y/o acumulación puede llevarse a cabo para separar y aislar o purificar los microorganismos a partir de otros componentes de la muestra (por ej., no microorganismos o componentes de los mismos) y para acumular o capturar los microorganismos en una masa que puede ser transferida a un portaobjetos o placa de espectrometría de masas y subsiguientemente examinada para identificación y/o caracterización. La separación, el aislamiento y/o la acumulación no tienen que ser completos, es decir, no se requiere que tenga lugar el 100% de la separación. Solamente es necesario que la separación, el aislamiento y/o la acumulación de los microorganismos a partir de otros componentes de la muestra sean suficientes para permitir el análisis o el examen de los microorganismos sin interferencia sustancial de los otros componentes. Por ejemplo, la separación/el aislamiento puede resultar en una masa de microorganismos acumulados o capturados que es al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% pura o más.

35 En una realización, la etapa de separación, aislamiento y/o acumulación se realiza como una etapa de filtración en donde un dispositivo de filtración y transferencia de muestra (como se describe aquí) se coloca en la muestra (por ej., una muestra lisada) en un recipiente y se aplica un vacío al dispositivo de filtración y transferencia, que permite que los microorganismos sean separados, aislados y/o acumulados (por ej., los microorganismos pueden ser acumulados o capturados en el material de filtración (por ej., una membrana filtrante) del dispositivo de filtración y transferencia) a partir de otros componentes que pueden estar presentes en la muestra. Según esta realización, otros componentes de la muestra (por ej., no microorganismos o componentes de los mismos que pueden estar presentes en el medio de muestra) pasan a través del filtro o material de filtración. Por consiguiente, esta etapa de filtración aísla, separa y/o acumula los microorganismos a partir de materiales en la muestra, como medio, residuos celulares, y/u otros componentes que podrían interferir con el análisis o examen de los microorganismos (por ej., por espectrometría de masas).

50 En consecuencia, en una realización, se describe un método novedoso para procesar rápidamente microorganismos a partir de una muestra (por ej., un cultivo líquido positivo), mediante un dispositivo de filtración y transferencia de muestra, para la caracterización y/o identificación del microorganismo. En una realización, el método comprende capturar y acumular microorganismos sobre o en un material filtrante y subsiguientemente transferir los microbios acumulados a un portaobjetos o placa objetivo para su análisis por espectrometría de masas. Con referencia ahora a la Figura 13, se muestra un método ejemplificado para separación/aislamiento, captura y acumulación, y la subsiguiente transferencia de los microorganismos para el análisis espectrométrico de masas. Como se muestra en la Figura 13, el método comprende las siguientes etapas: (1) obtener una muestra de ensayo que se sabe contiene, o puede contener, un microorganismo (por ej., un hemocultivo positivo) (etiquetada como etapa 1); (2) selectivamente lisar las células no microorganismo en la muestra de ensayo, y así producir una muestra lisada (etapa 2); (3) sumergir un dispositivo de filtración y transferencia de muestra (como se describe aquí) en una muestra lisada (etapa 3); (4) aplicar un vacío al dispositivo de filtración y transferencia de muestra, para así filtrar la muestra lisada a través del filtro, y de esta manera capturar al microorganismo en el material filtrante del dispositivo de filtración y transferencia integrado (etapa 4); (5) transferir el dispositivo de filtración y transferencia a un fluido o tampón de lavado, para lavar el filtro (etapa 5); (6) lavar el filtro aplicando o llevando un vacío en el dispositivo de filtración y transferencia, en donde se toma el fluido o tampón de lavado a través del filtro, y, en donde se lava así

5 cualquiera de los microorganismos capturados en el material filtrante (etapa 6); (7) transferir el dispositivo de filtración y transferencia a una placa objetivo de MALDI-TOF (descrita en más detalle a continuación) (etapa 7); (8) depositar los microorganismos en la superficie de la placa objetivo de MALDI-TOF (por ej., usando una técnica de aplicación de pequeñas cantidades (*dabbing*)) (etapa 8); (9) agregar solución matriz a la muestra de microorganismos sobre la placa (que se describe con más detalle a continuación) (etapa 9); y (10) adquirir un espectro de masas de la muestra de microorganismos utilizando MALDI-TOF (como se describe más adelante) (no se muestra).

Etapa de transferencia opcional

10 Después de acumular o capturar microorganismos sobre el material de filtración (por ej., una membrana filtrante) del dispositivo de filtración y transferencia, la siguiente etapa, en una realización del proceso, comprende la transferencia y el depósito de los microorganismos acumulados (es decir, como una masa o película) en un portaobjetos o placa objetivo para análisis y/o examen (por ej., por espectrometría de masas). Según la presente invención, el dispositivo de filtración y transferencia de muestra, además de proporcionar un dispositivo para capturar y acumular microorganismos a partir de una muestra de ensayo, también sirve como un dispositivo de
15 transferencia, para transferir y aplicar microorganismos sobre un portaobjetos o una placa objetivo para su análisis por espectrometría de masas.

20 En una realización, los microorganismos acumulados sobre el dispositivo de filtración y transferencia pueden aplicarse o directamente depositarse sobre un portaobjetos o una placa objetivo. Según esta realización, se pueden aplicar pequeñas cantidades con el dispositivo de filtración y transferencia (por ej., en forma vertical hacia arriba y hacia abajo) sobre un portaobjetos o una placa objetivo, una o más veces, para permitir que se transfiera una cantidad suficiente de microbios al portaobjetos o a la placa para su análisis. En algunos casos, la transferencia de microbios suficientes para su análisis puede requerir la aplicación de pequeñas cantidades en forma repetida.

25 En otra realización, los microorganismos acumulados sobre el dispositivo de filtración y transferencia pueden aplicarse o directamente depositarse sobre un portaobjetos o una placa objetivo empleando una técnica de flujo inverso. La técnica de flujo inverso comprende aplicar una suave presión inversa a través del dispositivo de filtración y transferencia integrado (por ej., con un bulbo de compresión o un conducto plegado) de manera que la punta exuda una pequeña cantidad de líquido. La presión inversa puede aplicarse mientras se aplican pequeñas cantidades con el dispositivo verticalmente en o sobre el recipiente, portaobjetos o placa objetivo hasta que se libera suficiente líquido para dejar aproximadamente 1-2 μ l de suspensión de flujo inverso y transferir así una cantidad
30 suficiente de microbios para su análisis por espectrometría de masas.

35 En otra realización, los microorganismos acumulados sobre el dispositivo de filtración y transferencia pueden aplicarse o directamente depositarse sobre un portaobjetos o una placa objetivo empleando una técnica de extensión. La técnica de extensión comprende extender o deslizar el material filtrante del dispositivo a través de la superficie de un portaobjetos o una placa objetivo, una o más veces, para permitir que se transfiera una cantidad suficiente de microbios al portaobjetos o placa para su análisis por espectrometría de masas. En algunos casos, la transferencia de microbios suficientes para el análisis por espectrometría de masas puede requerir que el dispositivo sea repetidamente extendido o deslizado sobre la superficie del portaobjetos o placa objetivo.

Etapa de análisis, medición y/o examen

40 Una vez que se han filtrado los microorganismos (por ej., usando el dispositivo de filtración y transferencia de muestra descrito aquí) para aislamiento y/o acumulación del microorganismo desconocido, la masa de microorganismo aislado y/o acumulado puede analizarse para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dicho microorganismo. En una realización, la muestra aislada o acumulada de dichos microorganismos puede analizarse empleando examen espectroscópico, por ej., en base a las características intrínsecas de los microorganismos (por ej., fluorescencia intrínseca) o la estructura vibracional de las moléculas
45 constituyentes (por ej., espectroscopia Raman). En otra realización, los microorganismos aislados o acumulados pueden ser analizados por espectrometría de masas (por ej., MALDI-TOF-MS). Otros detalles y la descripción de los métodos preferidos para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de dichos microorganismos pueden encontrarse en las solicitudes de patente de EE.UU. en tramitación con la presente: (1) N° 12/589.952 (actualmente publicada como US 2010/0129858 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Spectroscopy"; (2) N° 12/589.976 (actualmente publicada como US 2010/0156609 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Raman Spectroscopy"; y (3) N° 12/589.936 (actualmente publicada como US 2010/0120085 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Mass Spectrometry".

55 La muestra o masa de microorganismos aislados y/o acumulados puede examinarse espectroscópicamente. Pueden emplearse métodos espectroscópicos ópticos para analizar una o más propiedades intrínsecas de los microorganismos, por ej., una propiedad presente dentro del microorganismo en ausencia de agentes adicionales, como manchas, tintas, agentes aglutinantes, etc. En otros escenarios, pueden emplearse los métodos espectroscópicos ópticos para analizar una o más propiedades extrínsecas de los microorganismos, por ej., una

propiedad que solamente puede detectarse con la ayuda de agentes adicionales. El examen puede llevarse a cabo empleando, por ejemplo, espectroscopia fluorescente, espectroscopia de reflectancia difusa, espectroscopia infrarroja, espectroscopia de teraherz, espectroscopia de transmisión y absorbancia, espectroscopia Raman, incluyendo la Espectroscopia Raman de Superficie Mejoradas (SERS, por su versión en inglés "Surface Enhanced Raman Spectroscopy"), espectroscopia Raman compensada espacialmente (SORS, por su versión en inglés "Spatially Offset Raman spectroscopy"), espectroscopia Raman de transmisión, y/o espectroscopia Raman de resonancia. Para mejorar las señales Raman (SERS) y de fluorescencia, los microorganismos podría ser revestidos con nanopartículas de oro y/o plata antes de la centrifugación, y/o la superficie óptica interna podría ser pre-revestida con coloides de metal de tamaño y forma particulares (Re: Lakowicz, *Anal. Biochem.* 337: 171 (2005) con respecto a fluorescencia; Efrima et al., *J. Phys. Chem. B. (Letter)* 102:5947 (1998) con respecto a SERS). En una realización, la muestra o la masa de microorganismos aislados y/o acumulados se analiza para obtener mediciones útiles para la caracterización y/o identificación del microorganismo desconocido, mientras que la muestra o masa permanece en/sobre el dispositivo de filtración y/o transferencia de muestra. En otra realización, como se describe aquí, la muestra o la masa de microorganismos puede analizarse después de la transferencia a un recipiente, placa o portaobjetos.

En otras realizaciones, después de filtrar la muestra (por ej., empleando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra, como se describe aquí), se transfiere una porción de la muestra sobre una placa o portaobjetos para su introducción en un espectrómetro de masas. Se deposita una sustancia altamente absorbente sobre la parte superior de la muestra (por ej., matriz); este material tiene un coeficiente de absorción óptica muy alto con respecto a la frecuencia láser que se emplea para ionizar la muestra (por ej., para un láser de nitrógeno, la longitud de onda de emisión es 337 nm, de manera que el material absorbente tendría un coeficiente de gran absorción en una longitud de onda de 337 nm). Una vez que la muestra y la sustancia absorbente se han secado, la placa se inserta en el espectrómetro de masas. Después del tiempo necesario para reducir la muestra (es decir, para retirar los gases atmosféricos de la muestra de manera de tener un entorno de 10⁻⁵ a 10⁻⁷ torr), la muestra se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. La muestra es alineada con el sistema. Cuando se alcanza el alineamiento óptimo, se producen pulsos de láser de nitrógeno. La absorción de la energía láser por la matriz hace que esta se separe de la superficie de la placa debido a la alta energía depositada. Como un efecto secundario, las porciones de las células de microorganismos también se vaporizan e ionizan en el proceso. Estos iones son acelerados hasta una energía cinética conocida mediante la generación de un campo electrostático entre la placa y la entrada al tubo de vuelo del espectrómetro (es decir, esta porción del sistema es el discriminador de masa/carga). Todos los iones cargados individualmente, independientemente de la masa, tendrán la misma energía cinética en la entrada al tubo de vuelo, pero tendrán velocidades inversamente proporcionales a sus masas. A partir de aquí, los iones bajan por el tubo de vuelo hacia el detector, y los iones más livianos llegarán antes que los iones más pesados (el tubo de vuelo es un discriminador de masa/carga). El detector genera una carga eléctrica cada vez que un ion impacta en el detector. La salida del detector es digitalizada y la salida muestra la relación masa/carga sobre un eje y el número de impactos sobre el otro eje. En otras realizaciones, los microorganismos transferidos en la masa pueden ser examinados empleando técnicas de espectrometría de masas, como espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con ionización por desorción y electropulverización (DESI, por su versión en inglés "desorption electrospray ionization"), espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase gaseosa, espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase líquida, espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI, por su versión en inglés "electrospray ionization"), y espectrometría con tubo de flujo de iones seleccionados (SIFT, por su versión en inglés "selected ion flow tube").

En algunas realizaciones de la invención, la caracterización y/o identificación de los microorganismos en la muestra o masa aislada no necesita comprender la identificación de una especie exacta. La caracterización comprende la amplia categorización o clasificación de partículas biológicas así como la identificación real de una especie única. La clasificación de un microorganismo a partir de una muestra o masa aislada puede comprender la determinación de las características fenotípicas, morfológicas y/o metabólicas del microorganismo. Por ejemplo, la caracterización de las partículas biológicas puede llevarse a cabo en base a diferencias observables, como composición, forma, tamaño, agregación y/o metabolismo. En algunas realizaciones, la clasificación de las partículas biológicas de interés puede no requerir conocimiento previo de las características de una partícula biológica determinada, sino solamente correlaciones compatibles con las mediciones empíricas, lo que haría que este método fuera más general y fácilmente adaptable que los métodos en base a eventos de unión específica o reacciones metabólicas. Como se emplea aquí, "identificar" significa determinar a qué familia, género, especie y/o cepa pertenece un microorganismo previamente desconocido. Por ejemplo, identificar un microorganismo previamente desconocido a nivel de familia, género, especie, y/o cepa.

En algunos casos, la caracterización comprende modelos de clasificación que proporcionan información útil con respecto a la acción que se debe tomar. Los detalles adicionales y la descripción de los modelos de clasificación contemplados pueden encontrarse en la solicitud de patente de EE.UU. también en trámite No. 12/589.936 (actualmente publicada como US 2010/0120085 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Mass Spectrometry". Como se describe allí, los modelos de clasificación preferidos comprenden agrupamientos en uno o más de los siguientes: (1) Grupos Gram; (2) Grupos Gram Clínicos; (3) Grupos Terapéuticos; y (4) Grupos Funcionales.

Equipo.

En la presente solicitud también se describe, aunque no se reivindica, un equipo para aislamiento, acumulación y/o purificación de microorganismos a partir de una muestra de ensayo. En su forma más simple, el equipo incluirá: (1) opcionalmente una solución o tampón de lisis de no microorganismo que se sabe está presente o puede estar presente en una muestra de ensayo; (2) un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado (como se describe aquí) para aislamiento, acumulación y/o purificación de microorganismos que pueden estar en una muestra de ensayo, y para la subsiguiente recolección y transferencia de los microorganismos; y (3) al menos un fluido o tampón de lavado para lavar la muestra de microorganismo aislado, acumulado y/o purificado. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado empleado en el equipo se describe en detalle aquí.

Opcionalmente, el equipo puede incluir una solución o tampón de lisis selectiva para selectivamente lisar o disolver las células y/o material en partículas no deseados que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, por ej., células sanguíneas y/o células tisulares. Se puede lisar o disolver las células y/o los material en partículas para permitir la separación y/o el aislamiento de microorganismos a partir de otros componentes de la muestra. La separación y/o el aislamiento de microorganismos a partir de otros componentes impide la interferencia durante cualquier aplicación de ensayo directa subsiguiente, por ejemplo, el análisis o examen con respecto a la caracterización y/o identificación del microorganismo (por ej., por espectrometría de masas) o la realización de PCR microbiana de amplio rango sobre caldo de cultivo sanguíneo. Sin embargo, si no se espera encontrar células no microorganismo presentes en la muestra o no se espera que las mismas interfieran con cualquier ensayo subsiguiente, la etapa de lisis puede no ser necesaria.

En general, la solución de lisis selectiva puede utilizarse para lisar o disolver células no microorganismo que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. Sin embargo, en otras realizaciones, la lisis selectiva de clases específicas de microorganismos puede ser conveniente y por lo tanto llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos aquí y según se conoce en la técnica. Por ejemplo, una clase de microorganismos no deseados puede ser selectivamente lisada, por ej., la levadura se somete a lisis mientras no lo son las bacterias o viceversa. En otra realización, los microorganismos deseados son lisados a fin de separar un componente subcelular particular de microorganismos, por ej., membranas celulares u orgánulos. En un escenario, la totalidad de las células no microbianas son lisadas. En otros escenarios, una porción de las células no microbianas son lisadas, por ej., células suficientes para impedir la interferencia con la etapa de examen. La lisis de las células puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica como efectivo para selectivamente lisar células con o sin lisis de microorganismos, incluyendo, sin limitación, la adición de una solución de lisis, sonicación, choque osmótico, tratamiento químico, y/o una combinación de lo anterior.

La solución de lisis es aquella capaz de lisar células, por ej., células no microorganismo (por ej., al solubilizar o disolver las membranas de células eucarióticas) y/o células microorganismo. En una realización, la solución de lisis puede comprender uno o más detergentes, opcionalmente una o más enzimas, o una combinación de uno o más detergentes y una o más enzimas, y puede además incluir agentes adicionales. En una realización, el detergente puede ser un detergente lítico no desnaturizante, como Triton® X-100, Triton® X-100-R, Triton® X-114, NP-40, Genapol® C-100, Genapol® X-100, Igepal® CA 630, Arlasolve™200, Brij® 96/97, CHAPS, octil-β-D-glucopiranosido, saponina y nonaetilenglicol-monododecil-éter (C12E9, polidocanol). Opcionalmente, se pueden incluir detergentes líticos desnaturizantes, como dodecilsulfato sódico, N-laurilsarcosina, desoxicolato sódico, sales biliares, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, SB3-10, SB3-12, amidosulfobetaina-14 y C7BzO. Opcionalmente, también se pueden incluir agentes solubilizantes, como Brij® 98, Brij® 58, Brij® 35, Tween® 80, Tween® 20, Pluronic® L64, Pluronic® P84, sulfobetainas no detergentes (NDSB 201), anfipoles (PMAL-C8) y metil-β-ciclodextrina. Típicamente, los detergentes no desnaturizantes y solubilizantes se emplean en concentraciones por encima de su concentración micelar crítica (CMC), mientras que los detergentes desnaturizantes pueden agregarse a concentraciones por debajo de su CMC. Por ejemplo, los detergentes líticos desnaturizantes pueden emplearse a una concentración de aproximadamente 0,010% a aproximadamente 10%, por ej., de aproximadamente 0,015% a aproximadamente 1,0%, por ej., de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%, por ej., de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,30% (concentración final después de dilución con la muestra). En otro escenario, pueden preferirse los detergentes que comprenden un grupo de "cabeza" de polioxitileno hidrofílico unido a un grupo de "cola" de alcano o alqueno hidrofóbico mediante un enlace de éter. Estos detergentes son comúnmente especificados utilizando la indicación de la forma C_xE_y, en donde "x" es igual al número de carbonos en la cadena alcano o alqueno, mientras que "y" es el número de monómeros de oxietileno (CH₂CH₂O) en la cadena polioxitileno. Se prefieren los detergentes de este tipo en donde x se encuentra dentro del intervalo de 10-20 e y está dentro del intervalo de 8-12. Todavía más preferidos son los detergentes de este tipo en donde x está dentro del intervalo de 12-18 e y está dentro del intervalo 9-11. Por ejemplo, el detergente de alcano-polioxitileno o alquenopolioxitileno puede seleccionarse entre el grupo que consiste en Brij® 97, Brij® 96V, Genapol® C-100, Genapol® X-100, nonaetilenglicol-monododecil-éter (polidocanol), o una combinación de los mismos.

Las enzimas que pueden emplearse en soluciones de lisis incluyen, sin limitación, enzimas que digieren ácidos nucleicos y otros materiales que obstruyen las membranas (por ej., proteinasa, DNasa, neuraminidasa, polisacaridasa, Glucanex®, y Pectinex®). Otros aditivos que pueden emplearse incluyen, sin limitación, agentes reductores como 2-mercaptoetanol (2-Me) o ditiotreitól (DTT) y agentes estabilizantes como magnesio, piruvato y humectantes. La solución de lisis puede estar tamponada a cualquier pH que sea adecuado para lisar las células

deseadas, y dependerá de múltiples factores, incluyendo, sin limitación, el tipo de muestra, las células a ser lisadas, y el detergente empleado. En algunas realizaciones, el pH puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 13, por ej., aproximadamente 6 a aproximadamente 13, por ej., aproximadamente 8 a aproximadamente 13, por ej., aproximadamente 10 a aproximadamente 13. Los tampones de pH adecuado incluyen cualquier tampón capaz de mantener un pH en el intervalo deseado, por ej., aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 1,0 M en CAPS. Para algunos tipos de muestra (por ej., orina), el pH óptimo para la disolución de células y/o material en partículas no deseados puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 8.

El kit incluirá también al menos un fluido o tampón de lavado para lavar el microorganismo o masa de microorganismos aislados, acumulados y/o purificados sobre el material filtrante. El tampón de lavado puede emplearse para además separar, aislar o purificar los microorganismos acumulados o capturados, "eliminando" otros componentes (por ej., medios, componente del medio, residuos celulares, no microorganismos o componentes de los mismos) que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. Como apreciará fácilmente un experto en la técnica, el uso de un tampón de lavado permite o facilita la eliminación (o el paso a través del material filtrante) de medio, componentes del medio, residuos celulares, no microorganismos o componentes de los mismos, que pueden de otro modo interferir con los ensayos posteriores (por ej., análisis por espectrometría de masas). El tampón de lavado puede también emplearse para neutralizar rápidamente el pH alcalino de la solución de lisis. En general, puede incluirse cualquier fluido o tampón de lavado en el kit. Por ejemplo, el tampón de lavado podría ser agua destilada. En otra realización, el tampón de lavado podría ser un tampón de pH capaz de mantener un pH adecuado para microorganismos, como un tampón fosfato, MOPS o TRIS. Por ejemplo, el tampón de lavado podría ser una solución de fosfato de 0,01 M a aproximadamente 0,2 M, pH de 6,0 a 7,5

Además, el kit puede también comprender un dispositivo de filtración, una fuente de vacío y/o una interface de vacío. El dispositivo de filtración puede adaptarse para fijación a una fuente de vacío o un sistema de vacío, que funciona para proporcionar un vacío para filtración (es decir, para filtración de vacío). En general, puede emplearse cualquier medio conocido en la técnica para conectar el dispositivo de filtración y transferencia de muestra al sistema de vacío. Por ejemplo, el dispositivo de filtración y transferencia puede conectarse a un sistema de vacío con el uso de un tubo de vacío simple, según se conoce en la técnica. Por ejemplo, el kit puede comprender un frasco al vacío de brazo lateral (ver Figuras 2-3, número 2) con porta-filtro reutilizable o un conector (ver Figura 3, número 4) con un reservorio de filtrado y una pluralidad de porta-filtros reutilizables (ver Figura 3, número 6). En aun otras realizaciones, el kit puede además comprender componentes adicionales para filtración, por ejemplo, el kit puede comprender uno o más tubos, pinzas, válvulas, o el kit puede comprender uno o más tubos, pinzas, válvulas o trampas de vacío. En otra realización, el kit puede comprender uno o más dispositivos de filtración descartables que tienen una membrana de filtración incorporada. En estos dispositivos descartables, puede activarse la filtración ya sea por una fuente de vacío o por centrifugación.

El kit puede también incluir un recipiente (por ej., un tubo), dentro del cual puede llevarse a cabo la etapa de lisis. El recipiente puede ser cualquier recipiente con volumen suficiente para contener una muestra de ensayo y opcionalmente una solución de lisis. En una realización, el recipiente puede ser un tubo. En otra realización, el kit puede incluir el dispositivo de separación descrito en la solicitud de patente relacionada de los EE.UU. No. 12/589,969 (actualmente publicada como US 2010/0120133 A1), presentada el 30 de octubre de 2009, con el título "Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms". El volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 25 ml, por ej., de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, por ej., de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 8 ml. Si la etapa de lisis y la posterior etapa de aislamiento o separación se realizan a una microescala, el volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 2 μ l a aproximadamente 100 μ l, por ej., de aproximadamente 5 μ l a aproximadamente 50 μ l. El recipiente puede tener un dispositivo de cierre fijo o puede tener una rosca para aceptar un dispositivo de cierre (por ej., una tapa) de modo que el recipiente puede estar herméticamente sellado durante su uso. La presencia de un cierre reduce los riesgos de manipular microorganismos que son o pueden ser infecciosos y/o peligrosos, así como el riesgo de contaminar la muestra. Por ejemplo, el kit puede contener de 1 a 500 recipientes (por ej., tubos) dentro de los cuales puede llevarse a cabo la etapa de lisis. En otras realizaciones, el kit puede contener de 1 a 100, de 10 a 80, o de 10 a 50 recipientes dentro de los cuales se puede llevar a cabo la etapa de lisis. En otras realizaciones, el kit puede contener 20, 50, 75 o 100 recipientes dentro de los cuales puede realizarse la etapa de lisis.

El kit puede también incluir uno o más portaobjetos para ensayo o placas objetivo para el análisis o examen de los microorganismos (por ej., por espectrometría de masas). Según esta realización, los microorganismos acumulados en el dispositivo de filtración y transferencia integrado pueden aplicarse o directamente depositarse en o sobre un portaobjetos de ensayo o placa objetivo para las ensayos subsiguientes. Según esta realización, los microorganismos aislados, acumulados y/o purificados en el dispositivo de filtración y transferencia integrado pueden transferirse o depositarse sobre un portaobjetos o una placa (por ej., usando una técnica de aplicación de pequeñas cantidades, flujo inverso y/o extensión) sobre el portaobjetos o la placa objetivo para permitir la posterior experimentación y/o análisis, como se describe con más detalle aquí. Por ejemplo, el kit puede contener de 1 a 500 portaobjetos de ensayo o placas objetivo. En otras realizaciones, el kit puede contener de 1 a 100, o de 10 a 80, o de 20 a 50 portaobjetos de ensayo o placas objetivo. En otras realizaciones, el kit puede contener 20, 50, 75 o 100 portaobjetos de ensayo o placas objetivo para posterior experimentación y/o análisis.

En general, el kit puede configurarse para procesar cualquier número de muestras de ensayo (es decir, para aislamiento, acumulación y/o purificación de microorganismos a partir de cualquier número específico de muestras de ensayo). Por ejemplo, el kit puede configurarse para procesar (aislar, acumular y/o purificar microorganismos) desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 muestras de ensayo, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 muestras de ensayo, o desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 muestras de ensayo. En otro ejemplo, el kit podría configurarse para procesar desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 80 muestras de ensayo, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 60 muestras de ensayo, o aproximadamente 50 muestras de ensayo.

La presente invención se detalla además en los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y que no pretenden limitar la invención en modo alguno. Se emplean las técnicas convencionales y ampliamente conocidas que se describen específicamente a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Lisis-filtración y espectrometría de masas mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado

Se “sembraron” microorganismos con un inóculo de aproximadamente 40 o 400 CFU en una suspensión de 1,0 ml de cada cepa de ensayo en frascos BacT/ALERT® SA o SN que contenían 10 ml de sangre humana. Las muestras de ensayo sembradas se mezclaron después volteando los frascos varias veces, se incubaron en una cabina BacT/ALERT® 3D Combo y se vigilaron para detectar el crecimiento microbiano dentro del frasco.

Las muestras de caldo de hemocultivo se retiraron de los frascos algunos minutos después de ser marcadas como positivas por el Sistema de Detección Microbiana BacT/ALERT® 3D. Si el frasco no se procesaba inmediatamente, se almacenaba a 2-8 °C, y más tarde se llevaba a temperatura ambiente colocando el frasco en un baño de agua a 37 °C durante 5-15 minutos antes del ensayo. Las muestras de caldo de hemocultivo positivas se procesaron para separar los microorganismos de los componentes de sangre y del medio que pudieran interferir con el análisis subsiguiente, de la siguiente manera:

(1) usando una jeringa de 1 ml y aguja 18G, se transfirieron 0,5 mL de caldo positivo a un tubo de micrófuga limpio de 1,5 ml;

(2) al caldo se añadieron 0,25 ml de tampón de lisis (0,45% peso/volumen de Brij-97 + CAPS 0,3M, pH de 11,7 (filtrado a través de filtro de 0,2 µm, y almacenado a 2-8 °C)) y se mezcló mediante suave aspiración/suministro 5-6 veces, con cuidado para evitar la formación de burbujas tanto como fuera posible, y la mezcla se incubó durante 2:00 a 2:15 minutos a temperatura ambiente, con lo que se generó una muestra lisada o un lisado;

(3) después de la incubación y la lisis, la punta de un dispositivo de filtración y transferencia integrado se sumergió aproximadamente 3-5 mm en el lisado y se aspiró al vacío durante 2:00 a 2:15 minutos a temperatura ambiente, a medida que el líquido se llevaba al fondo del dispositivo de filtración y transferencia integrado, y se ajustó para mantener una profundidad de aproximadamente 3-5 mm;

(4) después de que la muestra se filtró al vacío durante 2:00 - 2:15 minutos, el dispositivo de filtración y transferencia se trasladó a un recipiente que contenía una primera solución de lavado (Brij/Salina (0,45% peso/volumen de NaCl+ 0,05% de Brij 97)), se sumergió, y se aspiró al vacío durante 4:00 - 4:15 minutos a temperatura ambiente;

(5) después de la primera etapa de lavado, el dispositivo de filtración y transferencia se trasladó a un segundo recipiente que contenía una segunda solución de lavado (agua desionizada), se sumergió en la primera solución de lavado, y se aspiró al vacío durante 4:00 - 4:15 minutos a temperatura ambiente;

(6) los microbios lavados se aplicaron después a uno o más puntos de manchado en las placas diana MALDI-TOF usando una técnica de aplicación vertical de pequeñas porciones en forma repetida, o alternativamente por inversión de flujo, hasta que se depositó un residuo visible de 1-2 µl de suspensión;

(7) los puntos se secaron y después se agregó 1µl de matriz;

(8) después de aplicar y secar todas las muestras para una placa diana determinada, los puntos de manchado se analizaron por MALDI-TOF MS.

Ejemplo 2: Lisis-filtración y espectrometría de masas mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado que comprende filtros de membrana

Cuarenta y cuatro (44) aislados de microorganismos se desarrollaron, procesaron y analizaron mediante MALDI-TOF MS, como se describe en el Ejemplo 1, empleando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que usa Supor® 450 (Pall-Gelman, Port Washington, NY) como material filtrante, y una técnica de inversión de flujo para depositar el microorganismo acumulado en la placa de MALDI-TOF.

Una vez que todas las muestras de microorganismo se habían secado completamente, se obtuvieron espectros de masas por MALDI-TOF para cada una en un intervalo de masa/carga de 2.000-34.000 en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Axima Assurance (Shimadzu Biotech North America, Maryland).

- 5 Después de la obtención de cada espectro de masas, se introdujo una tabla de picos de masa en el software de identificación de microorganismos “Sammis” (bioMerieux Inc., USA) para su análisis. Este software consiste en una base de datos de los espectros de masas de MALDI-TOF recolectados a partir de microorganismos desarrollados en agar.

La Tabla 1 a continuación muestra los resultados de la identificación (ID) mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado con una membrana Supor 450.

- 10 Tabla 1 – Dispositivo Supor 450 – Técnica de inversión de flujo – Frascos SA

Material aislado	Confianza de ID		Material aislado	Confianza de ID
<i>E. coli</i> , 104471	3		<i>S. epidermidis</i> , D055	2
<i>E. coli</i> , 100257	4		<i>S. epidermidis</i> , D069	0
<i>E. coli</i> , D104	4		<i>S. epidermidis</i> , D082	4
<i>E. coli</i> , D168	4		<i>S. epidermidis</i> , D092	3
<i>P. aeruginosa</i> , 105716	4		<i>E. faecalis</i> , D149	4
<i>P. aeruginosa</i> , 107930	4		<i>E. faecalis</i> , D135	3
<i>E. aerogenes</i> , 104098	3		<i>E. faecium</i> , 13243	0
<i>E. aerogenes</i> , 107930	3		<i>E. faecium</i> , 14334	0
<i>K. pneumoniae</i> , 108902	4		<i>E. faecium</i> , D068	0
<i>K. pneumoniae</i> , 105245	4		<i>S. pneumoniae</i> , 7265	2
<i>S. aureus</i> , 10754	0		<i>S. pneumoniae</i> , 14226	0
<i>S. aureus</i> , 8816	4		<i>S. pneumoniae</i> , D013	0
<i>S. aureus</i> , 7537	4		<i>S. pyogenes</i> , 11629	0
<i>S. aureus</i> , 7623	0		<i>S. pyogenes</i> , 11620	0
<i>S. aureus</i> , D164	2		<i>S. pyogenes</i> , 11631	0
<i>S. aureus</i> , D076	2		<i>S. pyogenes</i> , 12897	0
<i>S. aureus</i> , D116	3		<i>C. albicans</i> , 303070	4
<i>S. aureus</i> , D176	2		<i>C. albicans</i> , 18804	3
<i>S. epidermidis</i> , 13298	0		<i>C. albicans</i> , 302611	4
<i>S. epidermidis</i> , D011	0		<i>C. albicans</i> , 304765	0
<i>S. epidermidis</i> , D036	3		<i>C. albicans</i> , 304771	0
<i>S. epidermidis</i> , D042	0		<i>C. albicans</i> , 304776	3

Puntuaciones de confianza de ID

4 = 99,9%

3 = 85-99,8%

- 15 2 = ID de Especie < 85%, o Genero o Familia ≥ 85%

0 = Sin ID

Como se muestra en la Tabla 1, 22/44 (50%) recibieron una ID correcta con buena confianza, mientras que el 61% se identificó en al menos algún nivel.

5 Aunque la tasa de éxito de este experimento aún no era perfecta, demuestra que el concepto es muy prometedor. Se eligió este conjunto de microorganismos porque desafiaban la identificación directa a partir del hemocultivo mediante métodos centrifugos previos y, por lo tanto, proporcionaban una prueba rigurosa.

Hay muchas razones por las que estos primeros ensayos pueden no haber proporcionado ID correctas en todos los casos. Una posibilidad es que no hubiera suficiente masa celular, otra posibilidad es que las células depositadas tuvieran pureza insuficiente, o pudiera haberse dado una combinación de ambas circunstancias.

10 Si el problema es la masa celular, entonces otras membranas, o aun filtros profundos todavía no investigados, podrían capturar un mayor número de células. Otra posibilidad es aumentar la razón tiempo/volumen de captura para acumular una masa mayor.

Ejemplo 3: Espectrometría de masas por lisis-filtración mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado que comprende filtros de profundidad.

15 Cuarenta y seis (46) aislados de microorganismos se desarrollaron, procesaron y analizaron por MALDI-TOF MS como se describe en el Ejemplo 1, usando un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que emplea filtros de profundidad (filtro Whatman GF/F (0,7 micrómetros nominales) y filtros Metrigard (Pall-Gelman) (0,5 micrómetros nominales con aglutinante acrílico)) como material filtrante en lugar de membranas.

20 Los dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados realizados con los filtros Pall-Gelman Metrigard (0,5 micrómetros nominales con aglutinante acrílico) se sometieron a ensayo solamente sobre unas pocas de las muestras más problemáticas, pero dieron resultados tan buenos como los filtros GF/F o mejores.

Una vez que todas las muestras de microorganismos se habían secado completamente, se obtuvieron espectros de masas MALDI-TOF para cada una en un intervalo de masa/carga de 2.000-34.000 en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Axima Assurance (Shimadzu Biotech North America, Maryland).

25 Después de obtener cada espectro de masas, se introdujo una tabla de picos de masas en el software de identificación de microorganismos "Sammis" (bioMerieux Inc. USA) para su análisis. Este software consiste en una base de datos de los espectros de masa de MALDI-TOF recolectados a partir de microorganismos desarrollados en agar.

La Tabla 2 a continuación muestra los resultados de ID mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado que comprende un filtro Whatman GF/F o los filtros Pall-Gelman Metrigard.

30 Tabla 2 – Cultivos sembrados en frascos SA procesados con dispositivo de tipo filtro de profundidad

Material aislado	Dispositivo GF/F		Material aislado	Dispositivo GF/F	Dispositivo Metrigard
<i>E. coli</i> , 104471	4		<i>S. epidermidis</i> , D055	3	ND
<i>E. coli</i> , 100257	4		<i>S. epidermidis</i> , D069	3	ND
<i>E. coli</i> , D104	4		<i>S. epidermidis</i> , D082	4	ND
<i>E. coli</i> , D168	4		<i>S. epidermidis</i> , D092	4	ND
<i>P. aeruginosa</i> , 105716	4		<i>E. faecalis</i> , D149	4	ND
<i>P. aeruginosa</i> , 107930	4		<i>E. faecalis</i> , D135	4	ND
<i>E. aerogenes</i> , 104098	4		<i>E. faecium</i> , 13243	4	ND
<i>E. aerogenes</i> , 107930	4		<i>E. faecium</i> , 14334	4	ND
<i>K. pneumoniae</i> , 108902	4		<i>E. faecium</i> , D068	3	ND
<i>K. pneumoniae</i> , 105245	4		<i>S.pneumoniae</i> , 7265	3	ND
<i>S. aureus</i> , 10754	3		<i>S.pneumoniae</i> , 41226	3	3
<i>S. aureus</i> , 8816	4		<i>S.pneumoniae</i> , D0013	3	ND
<i>S. aureus</i> , 7537	4		<i>S.pneumoniae</i> , D002	3	ND

ES 2 683 032 T3

<i>S. aureus</i> , 7623	4		<i>S. pyogenes</i> , 11629	2	3
<i>S. aureus</i> , D164	4		<i>S. pyogenes</i> , 11620	0	2
<i>S. aureus</i> , D076	4		<i>S. pyogenes</i> , 11631	3	ND
<i>S. aureus</i> , D116	4		<i>S. pyogenes</i> , 12897	3	ND
<i>S. aureus</i> , D176	4		<i>C. albicans</i> , 303070	4	ND
<i>S. epidermidis</i> , 13298	3		<i>C. albicans</i> , 18804	4	ND
<i>S. epidermidis</i> , D011	4		<i>C. albicans</i> , 302611	2	4
<i>S. epidermidis</i> , D036	3		<i>C. albicans</i> , 304765	4	ND
<i>S. epidermidis</i> , D042	4		<i>C. albicans</i> , 304771	3	ND
			<i>C. albicans</i> , 304776	4	ND

Puntuaciones de confianza de ID

4 = 99,9%

3 = 85-99.8%

5 2 = ID de Especie < 85%, o Género o Familia ≥ 85%

0 = Sin ID

ND = No determinado

10 La Tabla 2 muestra los resultados de los cultivos sembrados que se desarrollaron en frascos SA y se procesaron con Dispositivo de Filtro realizado a partir de filtros de profundidad en lugar de membranas. En general, los resultados son muy buenos y similares a los mejores que se han obtenido mediante otros métodos de procesamiento. El dispositivo hecho con filtro Whatman GF/F (0,7 micrómetros nominales) dieron ID de confianza (≥85% de confianza) con respecto al nivel de especies (incluyendo los típicos resultados de baja discriminación con *S.pneumoniae* y *C.albicans*) con 43 de 46 aislados (93,5%), e ID para al menos género o especie en un nivel de confianza más bajo, con 45 de 46 aislados (97,8%).

15 Por consiguiente, el uso de filtros de profundidad muestra una mejora con respecto a los anteriores experimentos con filtros de membrana. Es posible que la mayor cantidad de células que pueden atraparse en un filtro de profundidad contribuyan a obtener mejores resultados, pero otro factor podría ser también la mejora en el lavado. Los recuentos de cepas Gram y/o células de los organismos capturados pueden ayudar a distinguir entre las dos posibilidades.

20 Otra diferencia con respecto a ensayos anteriores es que se reajustó el programa de adquisición de MALDI-TOF (según es necesario periódicamente debido al envejecimiento del instrumento/detector) entre los dos experimentos. El reajuste probablemente hubiera mejorado también los resultados del dispositivo de membrana, pero no representaría en forma exclusiva la magnitud de la diferencia observada con los filtros de profundidad.

25 Ejemplo 4: Lisis-filtración y espectrometría de masas mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado que comprende filtros de profundidad con frascos de medio que contienen resina.

30 Se desarrollaron, procesaron y analizaron cincuenta y un (51) aislados de microorganismos mediante MALDI-TOF MS como se describe en el Ejemplo 3, con el uso de un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que emplea filtros de profundidad Metrigard® excepto que a) los cultivos sembrados se desarrollaron en frascos que contenían medios aeróbicos con resinas en lugar de los frascos Bact/ALERT® SA, b) el tampón de lisis tuvo la siguiente composición (0,6% en peso/volumen de Brij-97 + 0,4M en CAPS, pH de 11,7), y c) la primera solución de lavado tenía la siguiente composición (fosfato de sodio 20 mM, 0,05% en peso/volumen de Brij 97, 0,45% en peso/volumen de NaCl, pH de 7,2).

35 Una vez que todas las muestras de microorganismos se habían secado completamente, se obtuvieron espectros de masas por MALDI-TOF para cada una en un intervalo de masa/carga de 2.000-34.000 en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Axima Assurance (Shimadzu Biotech North America, Maryland).

Después de obtener cada espectro de masas, se introdujo una tabla de picos de masa en el software de identificación de microorganismos "Sammis" (bioMerieux Inc. USA) para su análisis. Este software consiste en una base de datos de espectros de masas de MALDI-TOF recolectados entre microorganismos desarrollados en agar.

5 La Tabla 3 a continuación muestra los resultados de ID mediante el uso de un dispositivo de filtración y transferencia integrado con filtros Pall-Gelman Metrigard a partir de cultivos desarrollados en medios aeróbicos que contienen resina.

Tabla 3 – Cultivos sembrados en frascos con medios aeróbicos de resina procesados con dispositivo tipo filtro de profundidad

Material aislado	Confianza de ID		Material aislado	Confianza de ID
<i>E. coli</i> , 104471	4		<i>S. epidermidis</i> , 13298	4
<i>E. coli</i> , 100257	4		<i>S. epidermidis</i> , D011	4
<i>E. coli</i> , D104	4		<i>S. epidermidis</i> , D036	4
<i>E. coli</i> , D168	4		<i>S. epidermidis</i> , D055	4
<i>E. coli</i> -101262	4		<i>S. epidermidis</i> , D069	4
<i>E. aerogenes</i> , 104098	4		<i>S. epidermidis</i> , D082	4
<i>E. aerogenes</i> , 107930	4		<i>S. epidermidis</i> , D092	4
<i>K. pneumoniae</i> , 108902	4		<i>E. faecalis</i> , D149	4
<i>K. pneumoniae</i> , 105245	4		<i>E. faecalis</i> , D135	4
<i>K. pneumoniae</i> -104143	3		<i>E. faecalis</i> -15268	4
<i>K. pneumoniae</i> -108904	3		<i>E. faecalis</i> - 15282	4
<i>P. aeruginosa</i> , 105716	4		<i>E. faecium</i> , 13243	4
<i>P. aeruginosa</i> , 108042	4		<i>E. faecium</i> , 14334	4
<i>P. aeruginosa</i> -104014	4		<i>E. faecium</i> , D050	4
<i>P. aeruginosa</i> - 108937	4		<i>E. faecium</i> , D068	4
<i>S. aureus</i> , 10754	4		<i>S. pneumoniae</i> , 7265	3
<i>S. aureus</i> , 8816	4		<i>S. pneumoniae</i> , 14226	3
<i>S. aureus</i> , 7537	4		<i>S. pneumoniae</i> , D013	3
<i>S. aureus</i> , 7623	4		<i>S. pneumoniae</i> , D002	3
<i>S. aureus</i> , D164	4		<i>S. pyogenes</i> , 11629	3
<i>S. aureus</i> , D076	4		<i>S. pyogenes</i> , 11620	3
<i>S. aureus</i> , D116	4		<i>S. pyogenes</i> , 11631	3
<i>S. aureus</i> , D176	4		<i>S. pyogenes</i> , 12897	1
<i>S. albicans</i> , 303070	4		<i>H. influenzae</i> , 500891	3
<i>S. albicans</i> , 304771	2		<i>H. influenzae</i> , 500893	0
<i>S. albicans</i> , 304776	0			

Puntuaciones de confianza de ID

4 = 99,9 %

3 = 85-99,8%

2= ID de especie < 85%, o género o familia \geq 85%

5 0 = Sin ID

Como se muestra en la Tabla 3, son muy buenos los resultados de los cultivos sembrados que se desarrollaron en frascos que contenían resina y que se procesaron con Dispositivo de Filtro con filtros de profundidad. Estos cultivos procesados dieron ID de confianza (\geq 85% de confianza) con respecto al nivel de especie (incluyendo resultados típicos de baja discriminación con *S.pneumoniae* y *C.albicans*) con 47 de 51 aislados (92,2%).

10

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado que comprende:
- 5 un cuerpo alargado y hueco que tiene un primer extremo o punta que está provisto de, o tapado con, un material de filtración, en donde dicho material de filtración está situado adyacente a y sobresale de dicho primer extremo o punta;
- en donde dicho cuerpo alargado y hueco está lleno o taponado con un adsorbente para proporcionar soporte al material de filtración; y
- un segundo extremo operable para proporcionar flujo de fluido para la filtración.
- 10 2. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de la reivindicación 1, en donde dicho segundo extremo está adaptado para conexión a un sistema de vacío, una jeringa o un émbolo para generar un vacío.
3. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho cuerpo alargado y hueco está hecho de un material de plástico rígido o semi-rígido seleccionado del grupo de polipropileno (PP), policarbonato (PC), tereftalato de polietileno (PET), u otro material plástico.
- 15 4. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cuerpo alargado y hueco comprende un cuerpo alargado y cilíndrico que tiene un diámetro de 0,5 mm a 10 mm y una longitud de 2 cm a 20 cm.
5. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho cuerpo alargado y hueco tiene un volumen interno de 0,5 cm³ a 10 cm³.
- 20 6. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho adsorbente proporciona filtración pasiva mediante una acción capilar o fuerza de absorción para el flujo de fluido.
7. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de la reivindicación 6, en donde dicho adsorbente se selecciona del grupo que consiste en algodón, poliéster, una resina adsorbente, un gel de sílice, una hidrogel, un criba molecular, zeolita, u otros materiales adsorbentes.
- 25 8. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho material de filtración tiene un tamaño de poros de 0,1 µm a 10,0 µm.
9. El dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho material de filtración se selecciona del grupo que consiste en membranas de poliétersulfona (PES), polisulfona, éster de celulosa mixto, PVDF, policarbonato, materiales filtrantes profundos seleccionados entre el grupo que consiste en fibra de vidrio tipos GF/F, GF/C y GMF150, fibra de vidrio, fibra de vidrio AP15, así como una variedad de filtros de celulosa, poliéster, polipropileno u otros filtros de fibras y material en partículas, o una combinación de los mismos
- 30 10. Una unidad de filtración y transferencia de muestra que comprende: una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados de las reivindicaciones 1 a 9, para el aislamiento y/o la acumulación de una pluralidad de muestras de ensayo y para la transferencia simultánea de la pluralidad de microorganismos aislados y/o acumulados a un recipiente, portaobjetos o placa para analizar dichos microorganismos aislados o acumulados.
- 35 11. La unidad de filtración y transferencia de muestra de la reivindicación 10, en donde dicha unidad además comprende:
- una placa base y una placa superior separada de dicha placa base, en donde opcionalmente se proporciona al menos una varilla de soporte o un par de varillas de soporte verticales ubicadas entre dicha placa superior y dicha placa base y que separan a las mismas;
- 40 una gradilla que tiene una pluralidad de pocillos para contener una pluralidad de tubos individuales, en donde opcionalmente dicha gradilla está sostenida a través de un par de rieles de base y un par correspondiente de varillas guía de la gradilla;
- un brazo de eje vertical, opcionalmente asociado con una plataforma vertical, operable para permitir que dicho brazo de eje vertical se mueva hacia "arriba" y hacia "abajo", opcionalmente a lo largo de la plataforma vertical, para subir y bajar dicha placa superior y dicha pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados; y
- 45 una unidad de vacío que comprende una barra de alineamiento que contiene una pluralidad de orificios o cavidades para contener una pluralidad de dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados y extraíbles según las reivindicaciones 1 a 9, y un colector de válvulas asociado con una pluralidad de válvulas y conectores en donde cada uno individualmente sostiene y conecta a dichos dispositivos de filtración y transferencia de muestra integrados.
- 50

12. Un método para aislar e identificar un microorganismo a partir de una muestra de ensayo, que comprende:
- (a) proporcionar una muestra de ensayo que se sabe contiene o puede contener microorganismos;
 - (b) opcionalmente lisar células y/o material en partículas no microbianas en dicha muestra de ensayo para producir una muestra lisada;
 - 5 (c) aislar y acumular dichos microorganismos a partir de otros componentes de dicha muestra de ensayo o dicha muestra lisada por filtración, usando el dispositivo de filtración y transferencia de muestra integrado de las reivindicaciones 1-9;
 - (d) transferir dicha muestra de microorganismos aislados a un recipiente o portaobjetos adecuado para analizar y/o examinar dicha muestra de microorganismos aislada y acumulada;
 - 10 (e) analizar dicha muestra aislada o acumulada de dichos microorganismos para obtener mediciones para la caracterización y/o identificación de los microorganismos; y
 - (f) caracterizar y/o identificar dichos microorganismos en dicha muestra aislada y acumulada en base a las mediciones adquiridas.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha etapa de análisis (e) es por espectrometría de masas y en donde dicha espectrometría se selecciona del grupo que consiste en espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con ionización por electropulverización y desorción (DESI), espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase gaseosa, espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase líquida, espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI), y espectrometría con tubo de flujo de iones seleccionados (SIFT).
- 15
- 20 14. El método de las reivindicaciones 12 a 13, en donde dicha muestra es una muestra clínica o no clínica y en donde, cuando dicha muestra es una muestra clínica, entonces la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, fracciones sanguíneas, fluido articular, orina, semen, saliva, heces, fluido cerebroespinal, contenidos gástricos, secreciones vaginales, homogeneizados tisulares, aspirados de médula ósea, homogeneizados óseos, esputos, aspirados, hisopados y enjuagues de hisopados, fluidos corporales, una muestra
- 25 de hemocultivo, y una muestra de orina.

Fig. 1A

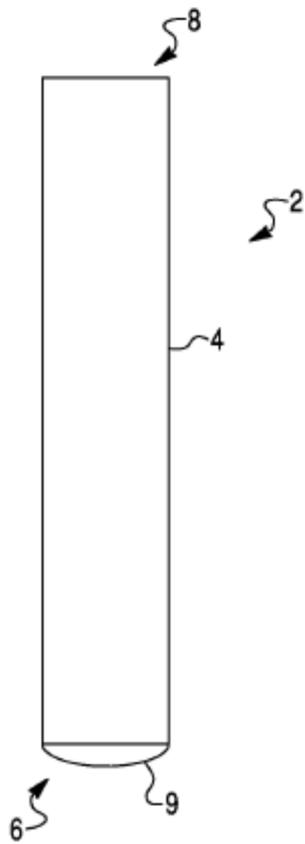


Fig. 1B

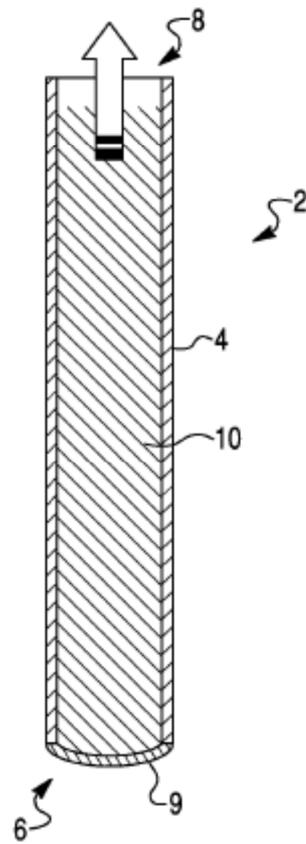


Fig. 2A



Fig. 2B

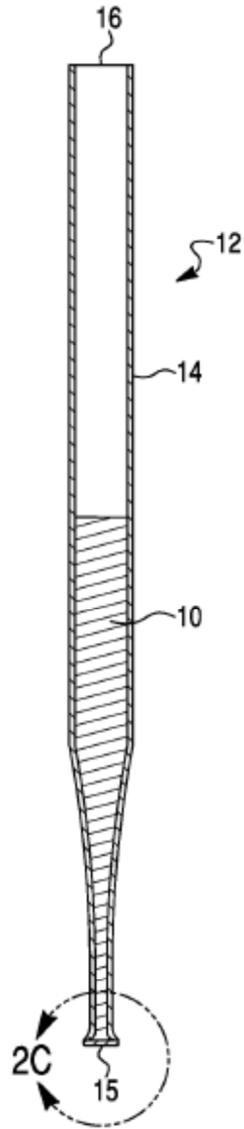


Fig. 2C

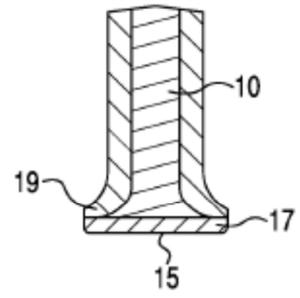


Fig. 3A

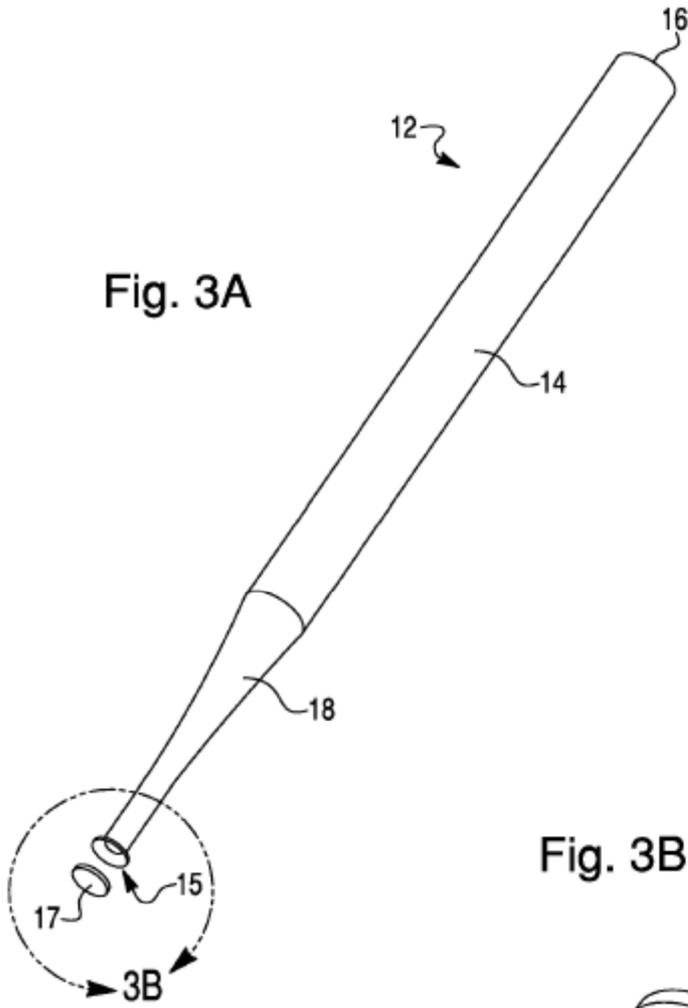


Fig. 3B

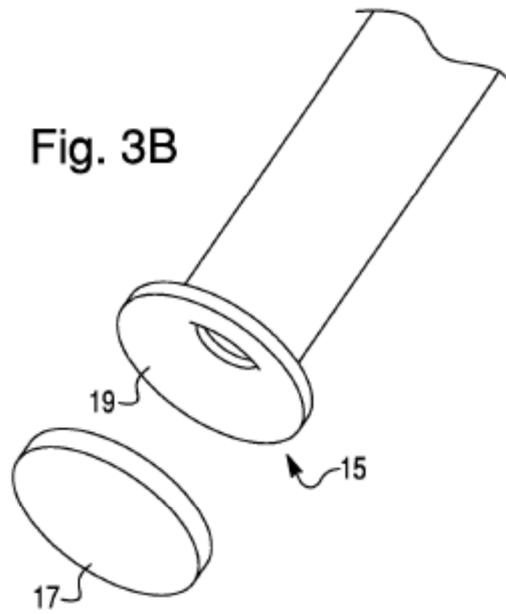


Fig. 4

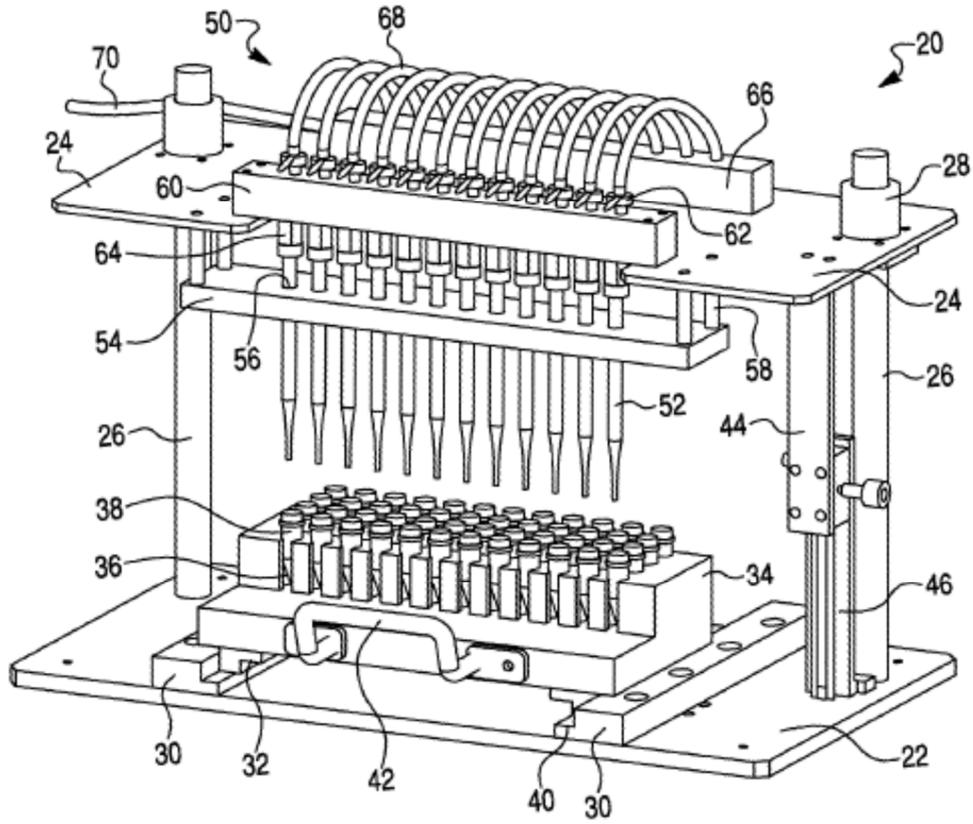


Fig. 5

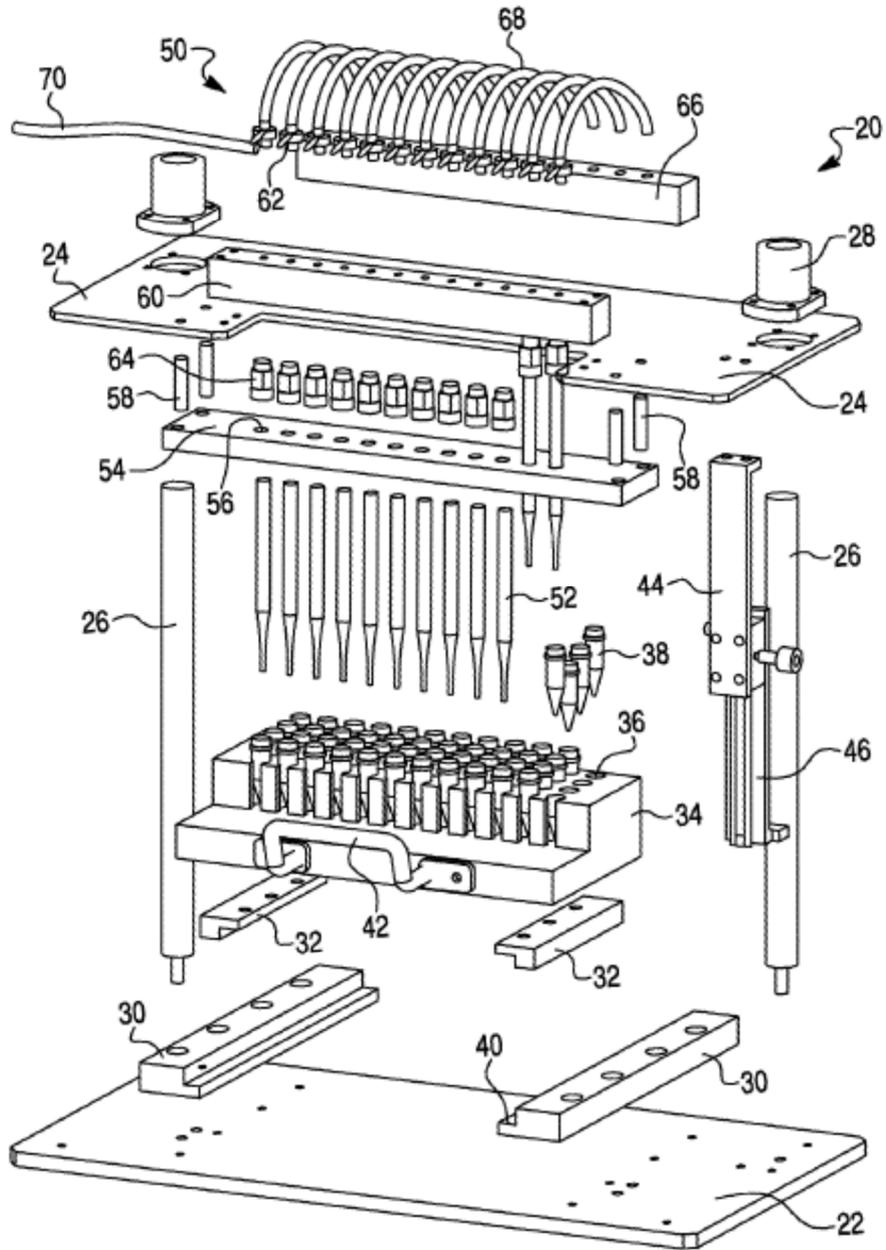


Fig. 6

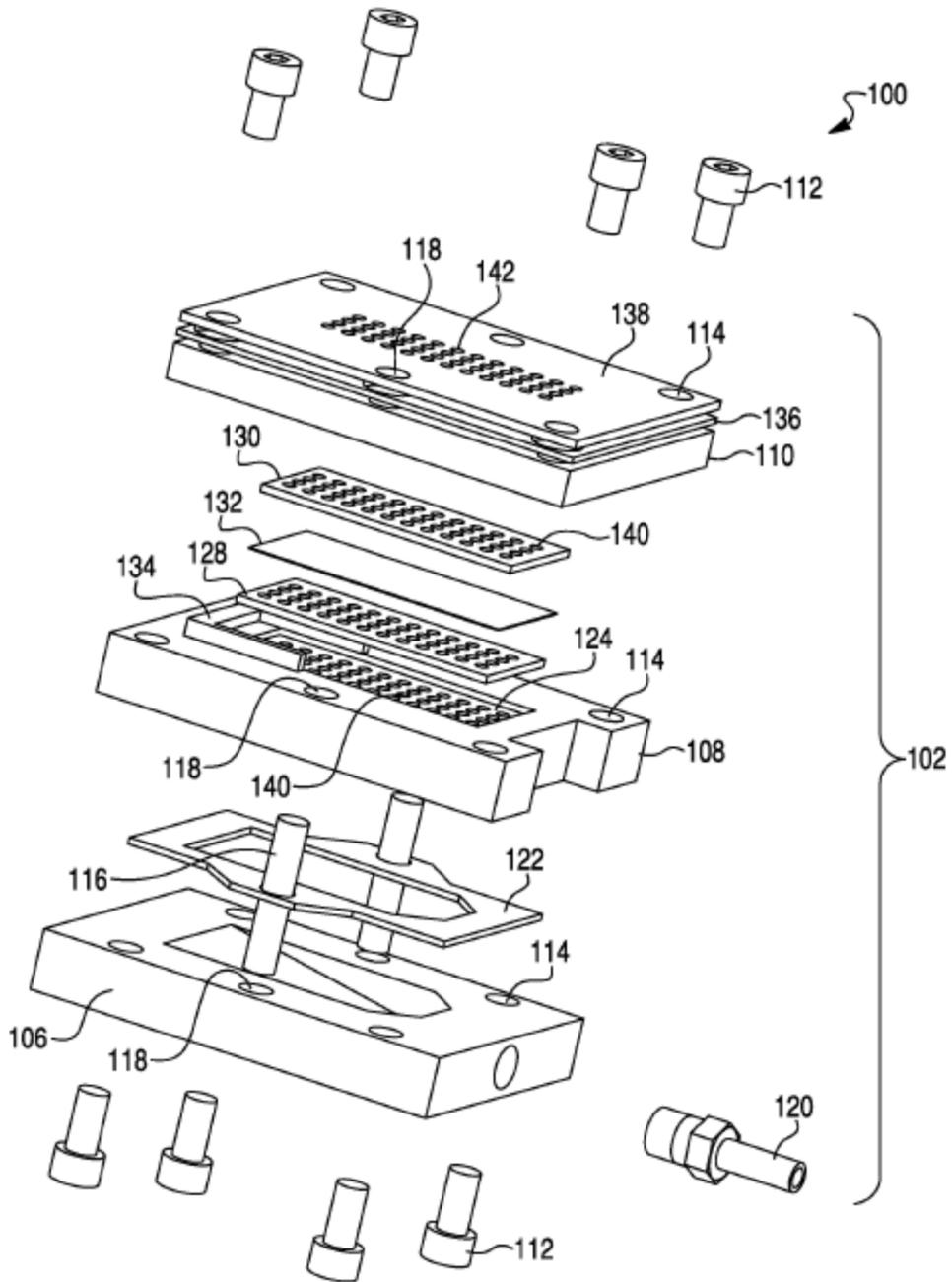


Fig. 7

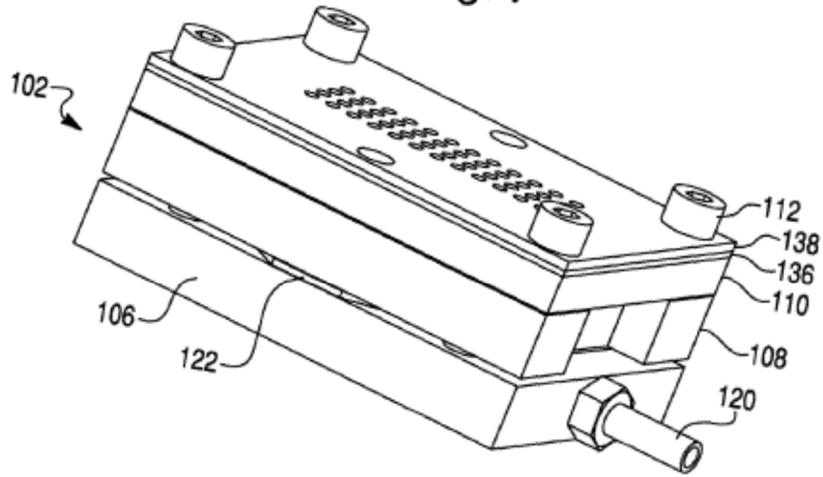


Fig. 8

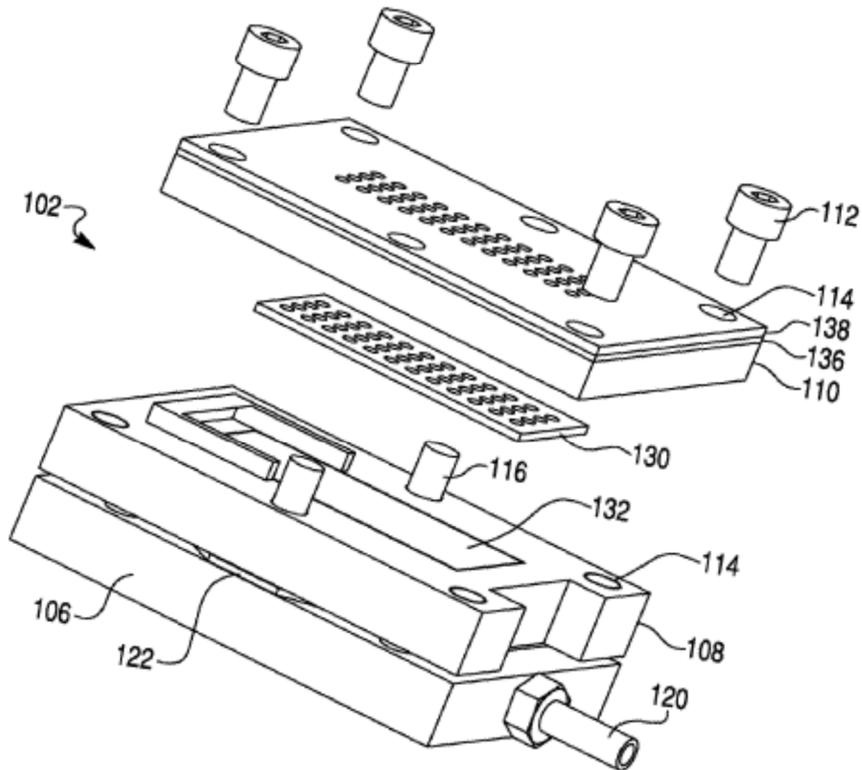


Fig. 9A

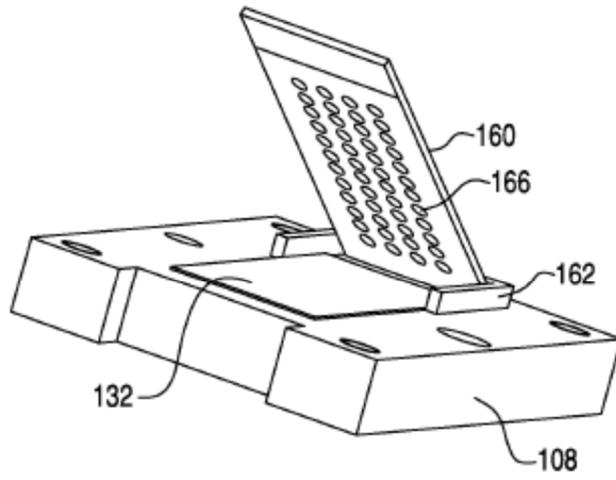


Fig. 9B

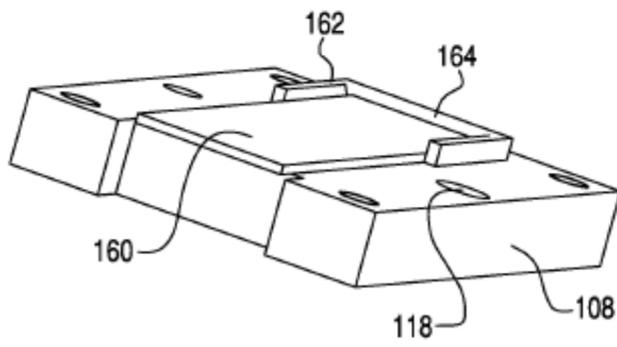


Fig. 9C

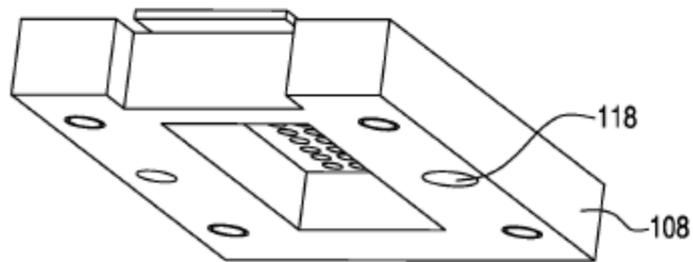


Fig. 9D

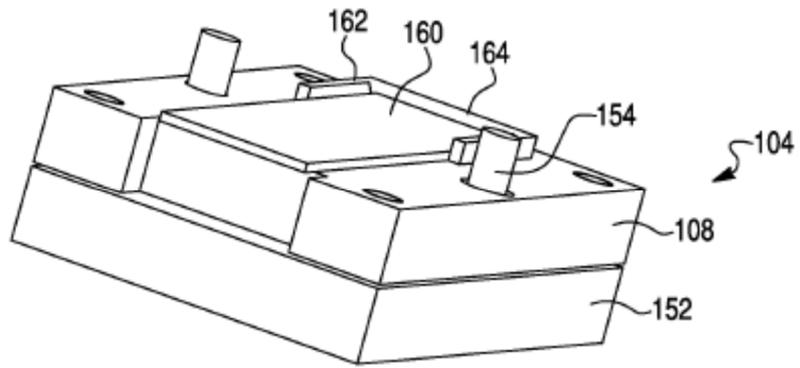


Fig. 9E

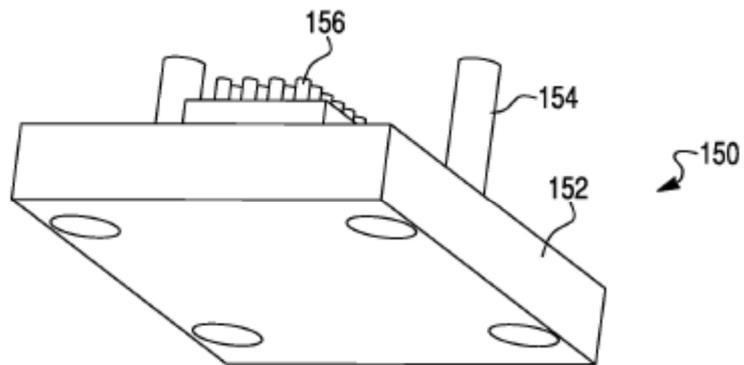


Fig. 10

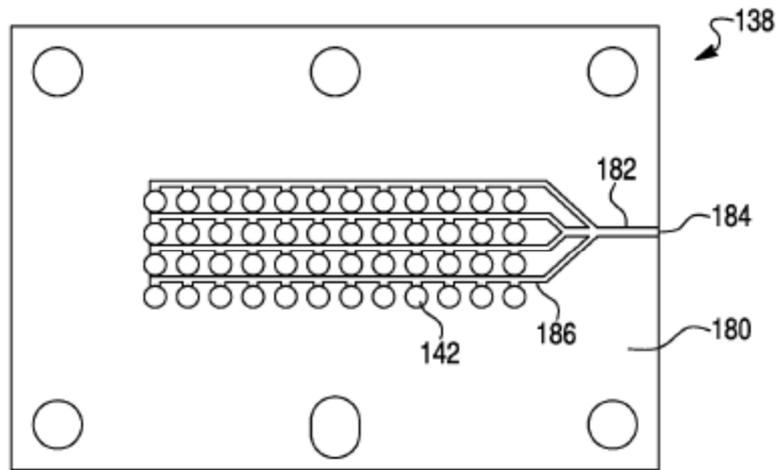
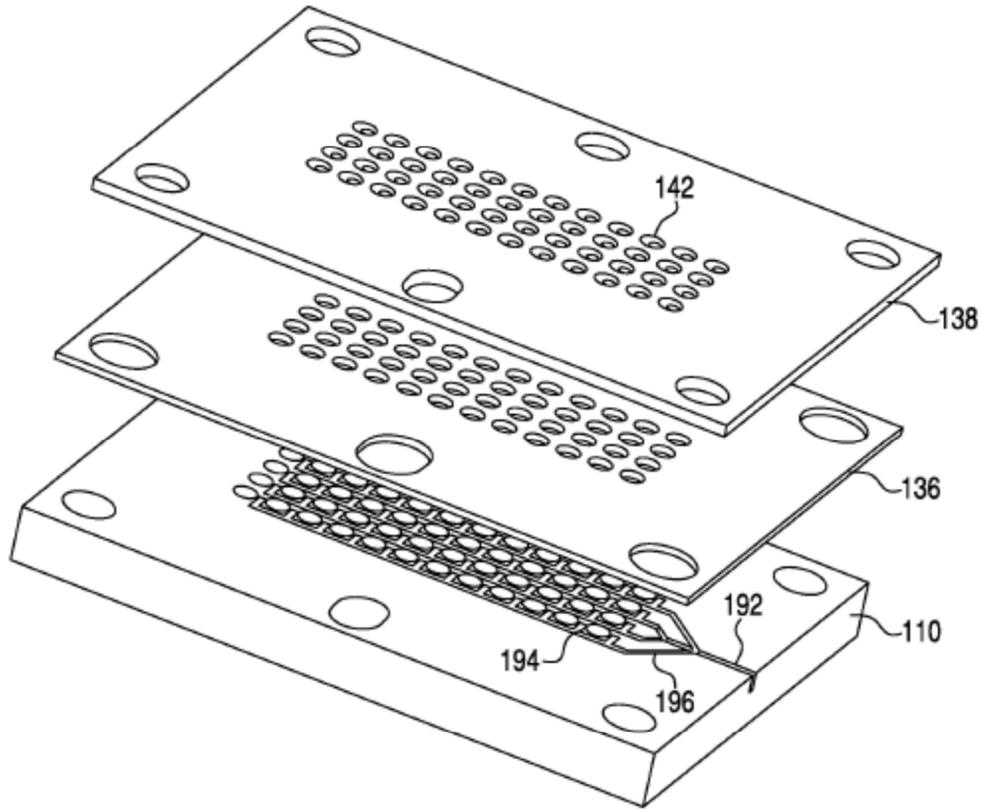


Fig. 11



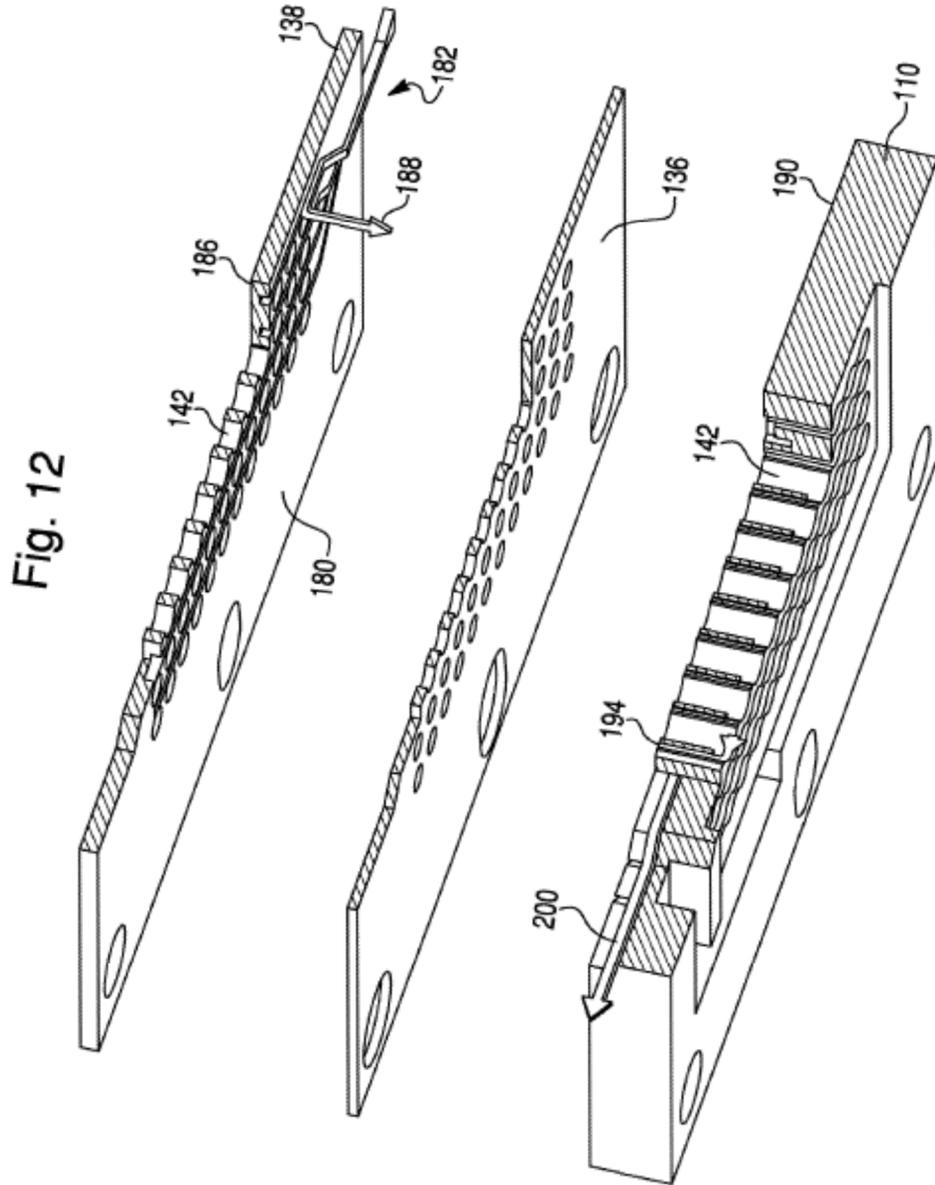


Fig. 13

