

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 784**

51 Int. Cl.:

G01N 1/38 (2006.01)

H01J 49/04 (2006.01)

H01J 49/16 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2009** **PCT/NL2009/050508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010** **WO10021548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009** **E 09788287 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 2329513**

54 Título: **Método y aparato para la identificación de material biológico**

30 Prioridad:

21.08.2008 EP 08162783

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

04.06.2020

73 Titular/es:

BIOSPARQ B.V. (100.0%)
Galileiweg 8
2333 BD Leiden, NL

72 Inventor/es:

WUIJCKHUIJSE, ARJAN LAURENS y
PARCHEN, RENÉ

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 784 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

Método y aparato para la identificación de material biológico

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para identificar material biológico que comprende microorganismos en una muestra de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1. Tal método se describe en un artículo titulado "Matrix-assisted laser desorption/ionization aerosol time of flight mass spectroscopy for the analysis of bioaerosols: development of a fast detector for airborne biological pathogens" por A.L. van Wuijckhuijse y cols., y publicado en el Journal of Aerosol Science Vol 36, págs. 677-697 (referencia EPO XP004936536). Este documento describe el uso de un nebulizador para nebulizar soluciones que se produjeron diluyendo muestras de mono-cultivos bacterianos a valores predeterminados. La nebulización mencionada en este documento no garantiza gotas de un tamaño uniforme. Como resultado, el número de bacterias por gota puede variar, pero esto no importó ya que solo se usó una especie de bacteria. Además, el método de nebulización de este documento requiere que se disponga de un gran volumen de muestra, incluso si se distribuye en pequeñas gotas.

Antecedentes

Es conocido el uso de espectroscopía de masas para la identificación de material biológico como microorganismos (p. ej., bacterias, virus), células, péptidos, etc.

MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization-Mass-Spectroscopy), por ejemplo, implica la ionización con láser del material de muestra que contiene microorganismos y el análisis espectroscópico de masas de las partículas ionizadas. En MALDI-MS, los microorganismos se preparan para la ionización proporcionando una mezcla de microorganismos y material de matriz en una placa diana. Mientras se seca la mezcla, el material de la matriz se adhiere a los microorganismos, lo que permite la ionización suave con una energía relativamente baja que conserva grandes fragmentos moleculares para el análisis de los constituyentes de los microorganismos. Se disparan los disparos de láser en ubicaciones diana deseadas en la placa diana con el fin de ionizar material de estas ubicaciones diana. Para cada ubicación diana se realiza un análisis espectroscópico de masas del resultado.

Se ha descubierto que MALDI-MS es muy adecuado para el análisis de laboratorio, pero persisten varios problemas. Para muestras con una mezcla no homogénea de microorganismos existe un grave riesgo de que un solo disparo con láser ionice el material de una mezcla de microorganismos de diferentes especies lo que complica la identificación de especies individuales. Incluso si se pudieran encontrar microorganismos únicos aislados en una placa diana, no sería posible detectarlos en el ruido de todo el material ionizado por un disparo láser. En MALDI-MS, estos problemas se superan mediante el uso de una etapa inicial de cultivo cuando la muestra original, tomada por ejemplo de un paciente in vivo, contiene una mezcla no homogénea de microorganismos. Se puede usar el cultivo para asegurar que se producen un número sustancial de microorganismos principalmente de una cepa dentro de un único disparo láser. Sin embargo, el cultivo puede durar más de un día. Como resultado, el MALDI-MS funcional no es adecuada si se necesita un breve tiempo de respuesta entre tomar una muestra in vivo y proporcionar un resultado de análisis. Esto limita su aplicabilidad.

Por ejemplo, en un ejemplo antes de transferir un paciente entrante a un entorno donde la bacteria MRSA podría ser dañina, sería deseable obtener una muestra del paciente e identificar la bacteria MRSA entre los muchos microorganismos presentes en la muestra. Para ser de uso práctico, el resultado de tal medición debería estar disponible en unas pocas horas como máximo. La necesidad de cultivar microorganismos impide el uso práctico de la MALDI-MS convencional para este propósito.

Se conoce un aparato para detectar e identificar partículas de bioaerosol en el aire en el documento WO02052246. Este aparato recoge aire que contiene partículas de aerosol y alimenta el aire con las partículas a través de una boquilla a una cámara de análisis. En la cámara de análisis se detectan partículas con microorganismos y las partículas detectadas se ionizan. El aparato requiere un número relativamente grande de partículas porque muchas partículas se pierden en la transición de la presión del aire al de alto vacío usado en la espectroscopía de masas. La eficacia de las partículas examinadas frente a las partículas capturadas puede ser tan baja como un uno por ciento.

A partir de la solicitud de patente de EE.UU. 2005/0230615, se conoce una técnica de medición MALDI-IM (Movilidad Iónica) en donde se forman gotas con un generador de aerosol de orificio vibratorio. No se describe nada a cerca de los microorganismos en las gotas. Si las gotas contuvieran microorganismos, el uso de MALDI-IM haría difícil, si no imposible, identificar estos microorganismos.

Se conoce el uso del Fraccionamiento de Flujo- Campo de Flujo (FFFF) en la preparación de una placa diana para MALDI-MS a partir de un artículo de Hookeun Lee y cols., titulado "Analysis of Whole Bacterial Cells by Flow-Field Flow Fractionation and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectroscopy" y publicado en Anal. Chem. 2003, 75, 2746-2752. Este documento muestra que el FFFF se puede usar para separar células bacterianas intactas para aumentar la densidad celular para MALDI-MS cuando se usa una placa diana.

Resumen

Entre otros, es un objetivo de la invención proporcionar un método y un aparato para identificar material biológico que pueda proporcionar resultados rápidamente en base a una muestra líquida con una mezcla de diferentes tipos de microorganismos como bacterias, hongos y virus.

- 5 Se proporciona un método para identificar material biológico que comprende microorganismos en una muestra de acuerdo con la reivindicación 1.

En esta memoria se forman gotas de líquido voladoras separando una corriente de líquido que comprende material biológico de una muestra y material de matriz de MALDI, por ejemplo, un material de matriz que forma cristales, en sucesivas partes de la corriente. Se puede usar, por ejemplo, un formador activo de gotas con un elemento piezoeléctrico. La ionización y la espectroscopía de masas se realiza sobre las gotas durante el vuelo. De esta manera, se puede eliminar la necesidad de una placa diana y sus desventajas mientras se logra una alta eficacia. Las gotas se pueden secar en vuelo, de tal modo que las gotas secas son partículas secas cuando se ionizan. Como se usa en esta memoria, el término "gota" incluye las partículas secas formadas secando las gotas. Preferiblemente, los espectros de masas se miden cada uno para el material de una de las gotas respectivas. La muestra o el líquido se diluye a un nivel de dilución que corresponde a una concentración en la que la densidad C de los microorganismos satisface $C \cdot V < 1$, donde V es un volumen de dichas partes del líquido. Por lo tanto, habrá menos de un microorganismo o célula en promedio en un volumen de gota en una gota individual. Por lo tanto, se puede asegurar que se pueden obtener un número considerable de mediciones de gotas con un único microorganismo o célula por gota. Como resultado, se pueden obtener los espectros de masas para microorganismos y/o células individuales.

20 En una realización, se puede adaptar el nivel de dilución a la concentración de células y/o microorganismos en la muestra. Se puede usar un detector de densidad para medir la concentración, por ejemplo, contando microorganismos detectados, y la concentración medida se puede usar para control de dilución. El detector de densidad puede comprender un citómetro (de flujo) ubicado para detectar la densidad en la corriente, por ejemplo, contando microorganismos en la corriente o en una corriente precursora que fluye en la corriente cuando se añade la matriz MALDI a la corriente precursora. En una realización, la corriente fluye hacia el formador de gotas sin ningún reordenamiento axial sustancial después del punto donde se genera la corriente con la muestra y el material de matriz. Es decir, las partes en las que se separa el líquido corresponden a secciones sucesivas de la corriente una vez que ya se ha añadido el material de matriz o al menos después de la dilución. De esta forma se reduce la probabilidad de gotas con múltiples microorganismos. Esto se mejora midiendo la densidad en esta corriente con un citómetro y controlando la dilución en base a esta medición. En una realización, la dilución se puede realizar mezclando el líquido transportador en la corriente abajo de la generación de la corriente. Esto también reduce la probabilidad de gotas con múltiples microorganismos.

Se proporciona un método para monitorizar los brotes de una infección con un microorganismo predeterminado en un hospital de acuerdo con la reivindicación 13.

- 35 Además, se proporciona un aparato para identificar material biológico en una muestra de acuerdo con la reivindicación 14.

El separador de la porción líquida puede ser, por ejemplo, un formador de gotas que comprende un resonador piezoeléctrico.

40 En otra realización, el separador de la porción líquida del aparato comprende una salida de suministro de corriente de gas y un conducto para suministrar una corriente del líquido a la salida configurada para formar una boquilla dinámica de gas.

En otra realización, el aparato comprende una unidad de dilución configurada para añadir diluyente a la muestra o al líquido a un nivel de dilución que corresponde a una concentración de menos de un microorganismo en promedio en un volumen de gota de las gotas individuales. Alternativamente, se puede usar una concentración en la que la mayoría de las gotas contienen como máximo un microorganismo de la muestra. En una realización adicional, la unidad de dilución comprende un detector de densidad configurado para detectar una densidad de la muestra o del líquido con la muestra y controlar la dilución a dicho nivel dependiendo de la densidad detectada.

En una realización, el separador de la porción líquida se puede configurar para lanzar las gotas directamente al espacio de vacío en el que se realiza la ionización.

- 50 En otra realización, el aparato comprende una unidad de control configurada para sincronizar la formación de gotas y la generación del pulso a partir de la fuente de radiación.

Breve descripción de las figuras

Estos y otros objetivos y aspectos ventajosos serán evidentes a partir de una descripción de realizaciones ejemplares.

Figura 1 muestra un aparato para identificar microorganismos

Figura 2 muestra un aparato de identificación con pantalla fluorescente

Figura 3 muestra un aparato de identificación con un separador ultrasónico

Figura 4 muestra un aparato de identificación adicional

Las realizaciones de las Figuras 1-4 son ejemplos útiles para comprender la invención.

5 Las Figuras 4a-c muestran ejemplos de separadores de corriente líquida

La Figura 5-7 muestra realizaciones de un aparato de identificación

Descripción detallada de realizaciones ejemplares

10 La Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato para identificar material biológico. Aunque se describirá una aplicación para la identificación de microorganismos en el contexto de este aparato, se debe apreciar que el aparato es solo una realización de un aparato que realiza espectroscopía de masas MALDI en gotas voladoras. Se debe entender que se puede usar otro material biológico en lugar de microorganismos, como células (p. ej., células sanguíneas, péptidos, etc.).

15 El aparato comprende un receptor de muestra 10, conductos 11, una primera unidad de mezcla 12, una segunda unidad de mezcla 14, una cámara 15, un resonador piezoeléctrico 16, un circuito de control 17, un láser de pulso 18 y un espectrómetro de masas 19. El resonador piezoeléctrico 16 puede ser del tipo usado en impresoras de inyección de tinta para formar gotas de tinta. Los conductos 11 conectan el receptor de muestra 10, la primera unidad de mezcla 12, la segunda unidad de mezcla 14 y el resonador piezoeléctrico 16 en serie. El circuito de control 17 está acoplado al resonador piezoeléctrico 16 y al láser de pulso 18.

20 El resonador piezoeléctrico 16 está ubicado en la cámara 15. El conducto 11 descarga desde la segunda unidad de mezcla 14 en una abertura a través del resonador piezoeléctrico 16. El láser de pulso 18 está dirigido a una trayectoria de vuelo de las gotitas lanzadas desde esta abertura a través de la cámara 15. El espectrómetro de masas 19 está conectado a la cámara 15 y ubicado para recibir fragmentos ionizados que surgen de la absorción de la radiación del láser de pulso 18 por las gotitas en la trayectoria de vuelo.

25 En funcionamiento, se separa una corriente de líquido que contiene material de muestra del receptor de muestra 10, diluyente de la primera unidad de mezcla 12 y material de matriz de la segunda unidad de mezcla 14 en secciones que dan como resultado una pequeña gota de líquido lanzada en vuelo a través de la cámara 15. Durante el vuelo a través de la cámara 15, el material de la matriz en una gota de líquido cristaliza alrededor de un microorganismo mientras la gota se seca en vuelo, dando como resultado una partícula seca. Posteriormente, se dispara un pulso de láser a la partícula seca del láser de pulso 18. Esto da como resultado la ionización del material a partir de la partícula seca. El material ionizado se analiza en el espectrómetro de masas 19.

30 Por ejemplo, se pueden usar gotas con un diámetro en un intervalo de 1-100 micrómetros. Preferiblemente, se usan gotas que tienen sustancialmente el mismo tamaño uniforme en este intervalo, que se puede realizar separando la corriente de líquido a distancias habituales, por ejemplo, aplicando una perturbación periódica de frecuencia apropiada en una corriente de velocidad de flujo promedio constante.

35 Debido al pequeño tamaño de las gotas, solo se necesita poco tiempo durante el vuelo para que las gotas estén preparadas para la ionización. Debido a que la preparación se produce en vuelo, se pueden formar microorganismos con material de matriz que rodea a un microorganismo por todos los lados. No se producen núcleos de cristalización en la interfaz entre las gotas y la placa diana como en el caso de MALDI-MS convencional. Preferiblemente, la combinación de la velocidad de dilución y el tamaño de la gota se selecciona de modo que la mayoría de las gotas con un microorganismo no contengan más de un microorganismo. Por ejemplo, se puede usar un nivel de dilución que corresponde a una concentración de como máximo un microorganismo en promedio en el volumen de una gota.

40 Debido a que el láser de pulso 18 se dispara a una partícula seca a la vez, cada espectro de masa medido de una partícula de una gota con un microorganismo representa solo un microorganismo. Además, el uso de gotas significa que el tamaño de la muestra que se ioniza está determinado por el tamaño de la gota y la cantidad de material disuelto y disperso dentro de la gota. Esto se debería contrastar con la MALDI-MS convencional, en donde el tamaño de la muestra está determinado por el tamaño del punto de láser en la placa diana, que puede ser mucho mayor que el tamaño de las gotas, de modo que se ionice más material que pueda dar lugar a un mayor nivel de "ruido" en el espectro de masas. Además, se puede ionizar una mezcla de diferentes microorganismos.

50 Se llevó a cabo un experimento para demostrar que se podía distinguir el *Staphylococcus Aureus* con y sin resistencia a la penicilina. En este experimento se usó la aerosolización de líquido que contiene material de muestra, diluyente y material de matriz. Se ionizaron las partículas individuales (gotitas secadas al vacío) con un láser de pulso y se obtuvo un espectro de masas del material ionizado. Se encontró que las partículas con *Staphylococcus Aureus* con resistencia a la penicilina y las partículas con *Staphylococcus Aureus* sin resistencia a la penicilina se podían distinguir en función de sus espectros de masas.

La primera unidad de mezcla 12 sirve como una unidad de dilución. Comprende un primer mezclador 120, un depósito de diluyente 122 y un detector 124. El depósito de diluyente 122 está acoplado al primer mezclador 120 para suministrar diluyente y el primer mezclador 120 está configurado para mezclar el diluyente con material de muestra desde el receptor de muestra 10. El detector 124 puede ser un detector óptico configurado para detectar la luz dispersada de microorganismos individuales cuando los microorganismos fluyen a través de un haz de medición, por ejemplo, en un conducto a través del cual circula el líquido con los microorganismos. Se puede determinar la densidad a partir de un recuento de microorganismos que se detectan en promedio por unidad de intervalo de tiempo. En otra realización, se puede medir una densidad de dispersión óptica a partir del líquido en el primer mezclador 120 que contiene diluyente y material del receptor de muestra 10.

Los detectores de este tipo son conocidos per se. Se puede usar un tipo conocido de citómetro o citómetro de flujo. Como se sabe per se, un citómetro puede ser un dispositivo que detecta fluctuaciones locales de la densidad de material biológico que corresponden a la diferencia entre la concentración espacial de material en microorganismos individuales frente al fondo del líquido circundante. Por ejemplo, se pueden detectar fluctuaciones temporales en una ubicación a través de la cual se produce un flujo de líquido con los microorganismos, o se pueden detectar fluctuaciones espaciales explorando una ubicación de detección. Se puede usar en la detección óptica, por ejemplo, usando un dispositivo que proporciona la detección de fluorescencia u otras propiedades ópticas centradas en una pequeña región con un tamaño inferior al volumen máximo de líquido por microorganismo. Se pueden usar uno o más detectores que detecten fluorescencia a longitudes de onda en las que el material como el NADH emite fluorescencia, que es característico de los microorganismos. Se pueden también usar otras propiedades ópticas como dispersión, difracción, etc.

El detector de partículas 124 se muestra acoplado a una entrada control del primer mezclador 120. El mecanismo control está dispuesto para aumentar la cantidad de diluyente añadido a la muestra hasta que la densidad medida haya descendido a una densidad predeterminada o por debajo de ella. Se puede usar un circuito de circulación de líquido para hacer circular la muestra diluida a lo largo de un punto de inyección de diluyente hasta que se haya alcanzado la densidad deseada. En la práctica, se puede usar un ordenador control (no mostrado) para recibir datos de medición del detector de densidad 124 y generar señales de control del mezclador basadas en estos datos.

En funcionamiento, se proporciona una muestra líquida que contiene microorganismos en el receptor de muestra 10. Una bomba (no mostrada) bombea material de muestra a la primera unidad de mezcla 12 a través del conducto 11. El primer mezclador 120 añade diluyente al material de muestra. Se puede usar agua o etanol como diluyente, por ejemplo. Se puede usar el procesamiento por lotes en donde se suministra un lote de material de muestra al primer circuito de mezcla 12, después de lo cual continúa el procesamiento con ese lote sin obtener material adicional del receptor de muestra 10 hasta que el lote se haya procesado y haya salido de la primera unidad de mezcla 12. Se puede usar, por ejemplo, un tamaño de lote en un intervalo de 0,01 a 10 mililitros.

Se usa un circuito de retroalimentación para aumentar la velocidad de dilución hasta que la densidad observada por el detector de densidad 124 haya descendido a un nivel predeterminado. En lugar de retroalimentación, se puede usar una solución de alimentación directa en donde se mide la densidad inicial y el nivel resultante se usa para controlar la cantidad de diluyente añadido al nivel predeterminado. En una realización, el nivel predeterminado se selecciona de modo que la mayoría de las gotas contendrán un microorganismo o menos. El nivel se puede establecer de modo que se alcance un promedio de menos de un microorganismo por gota o un promedio entre cuatro y un cuarto de microorganismo por gota. Cabe señalar que es suficiente un recuento general de microorganismos en el líquido, no específico para el tipo de microorganismo. Por lo tanto, se puede garantizar un número razonable de gotas con un solo microorganismo de cualquier tipo.

Se puede seleccionar el nivel real en combinación con el tamaño de las gotas que se controla mediante el establecimiento de parámetros de formación de gotas, usando una relación entre las mediciones del detector 124 y la concentración de microorganismos. En una realización, este nivel se puede establecer experimentalmente durante una etapa de calibración en base a las observaciones de la fracción de gotas en las que se observa material de microorganismos mediante espectroscopía de masas ajustando el nivel hasta que la fracción de gotas que contiene un microorganismo está en un nivel predeterminado, por ejemplo, de un décimo a la mitad de los espectros de masas generados. En un ejemplo, se puede usar una dilución de hasta una relación de dilución entre una y cinco muestras a diluyente.

Cabe señalar que la retroalimentación en la primera unidad de mezcla 14 sirve para asegurar que las muestras con diferentes concentraciones de microorganismos no produzcan grandes cambios en la eficacia, en términos del número de gotas útiles que no contienen microorganismos o en un número considerable de gotas que contienen más de un organismo. Si la concentración se puede controlar de antemano, no se necesita retroalimentación o determinación de la densidad. De forma similar, se puede omitir la retroalimentación o la determinación de la densidad si se sabe que la concentración no es tan alta que persista un riesgo de un número considerable de gotas con múltiples microorganismos después de una dilución predeterminada y se acepte una pérdida de eficacia. En este caso se puede usar una velocidad de dilución predeterminada o incluso se puede omitir la primera unidad de mezcla 12.

La segunda unidad de mezcla 14 comprende un segundo mezclador 140 y un depósito de material de matriz 142. El depósito de matriz 142 está acoplado al segundo mezclador 140 para suministrar material de matriz al segundo

mezclador 140 y el segundo mezclador 140 está configurado para mezclar el material de matriz con el material de muestra diluido de la primera unidad de mezcla 12.

En funcionamiento, el líquido se traslada de la primera unidad de mezcla 12 a una segunda unidad de mezcla 14. Aunque para este fin se ha mostrado un conducto 11, se debe entender que se puede mover de todas formas un lote de líquido a la segunda unidad de mezcla 14. En otra realización, la segunda unidad de mezcla 14 se puede combinar con la primera unidad de mezcla 14. En la segunda unidad de mezcla 14 se añade material de matriz MALDI. Los materiales de matriz MALDI son conocidos per se a partir de la técnica anterior. Se puede usar material de matriz que sea adecuado para cristalizar unido a microorganismos y que tenga una banda de absorción óptica adecuada para absorber los pulsos de láser para ionizar el material de los microorganismos. Se conoce una amplia gama de materiales de matriz adecuados. También se conocen materiales de matriz MALDI que no forman cristales. Se puede usar material de matriz MALDI dirigido a tipos de organismos específicos o material orgánico específico, aunque se puede usar alternativamente material de matriz MALDI aplicable a una amplia gama de organismos y/o materiales orgánicos. La segunda unidad de mezcla 14 se puede configurar para añadir material de matriz MALDI en una cantidad suficiente para proporcionar una relación molar matriz a analito en el orden de 100:1 a 10.000:1.

El líquido obtenido de la segunda unidad de mezcla 14 se bombea a una abertura a través del resonador piezoeléctrico 16 como una corriente continua de líquido a través del conducto 11. Aunque se muestra un conducto 11 que conecta directamente la segunda unidad de mezcla 14 con el piezo resonador, se debe entender que se puede transportar un lote de líquido desde la segunda unidad de mezcla 14 a una posición en una entrada del conducto 11 por cualquier otro medio. Se puede usar un depósito intermedio (no se muestra) en la entrada del conducto 11. Se puede usar una bomba de líquido (no se muestra) para bombear una corriente de líquido a través del conducto 11 al piezo resonador 16, o se puede usar una bomba para imprimir presión sobre el líquido en la segunda unidad de mezcla 14 o un depósito intermedio al que se ha movido el líquido con el fin de forzar la corriente de líquido al piezo resonador 16 a través del conducto 11. El conducto 11 puede ser tan corto para que se forme eficazmente una conexión directa desde la segunda unidad de mezcla 14 o del depósito intermedio a la abertura a través del piezo resonador 16.

En una realización, el piezo resonador 16 comprende un marco, una membrana con un orificio con una abertura de veinte micrómetros a la que se dirige el flujo de líquido y un material piezoeléctrico acoplado entre la membrana y el marco. Preferiblemente se usa una abertura de al menos diez micrómetros. El material piezoeléctrico está ubicado para hacer que el orificio se mueva hacia adelante y hacia atrás en la dirección del flujo del líquido. Se proporcionan electrodos en el material piezoeléctrico para impulsar el movimiento.

En funcionamiento, el circuito control 17 aplica una excitación eléctrica de alta frecuencia a los electrodos. Por ejemplo, se puede usar una frecuencia en un intervalo de 1 kHz a 1 MHz. El voltaje eléctrico de alta frecuencia provoca un movimiento periódico de la abertura en la dirección del flujo de líquido, lo que origina que la corriente de líquido se rompa en partes, lo que da lugar a gotas. Se lanzan una serie de gotas a lo largo de una trayectoria de vuelo a través de la cámara 15. Preferiblemente, se usa un ajuste constante de la frecuencia de excitación del piezo resonador 16 de modo que se producen gotas del mismo tamaño. Son conocidas per se las técnicas para controlar el tamaño de gota de la tecnología de impresión por chorro de tinta.

Aunque se ha descrito una realización ejemplar en donde se usa un piezo resonador 16 para separar la corriente de líquido en gotas, se debe apreciar que se pueden usar otras técnicas de formación de gotas.

En la cámara 15 se mantiene una atmósfera con una baja presión, por ejemplo, en el intervalo de una milésima de milibares a unos pocos milibares. La atmósfera puede consistir en cualquier gas. En un ejemplo se usa aire normal. La longitud de la trayectoria de vuelo desde el piezo resonador 16 hasta el punto de ionización es preferiblemente al menos tan larga para que el tiempo necesario para atravesar la trayectoria de vuelo, dada la velocidad de las gotas, sea suficiente para colocar la matriz en su lugar, p. ej., mediante cristalización. En una realización, se pueden usar uno o más separadores de boquilla a lo largo de la trayectoria de vuelo para reducir la presión de gas hasta que se alcanza un nivel adecuado para espectroscopía de masas. En una realización, se realiza espectrometría de masas a presiones cercanas a 10^{-6} milibares, o más generalmente por debajo de 10^{-5} milibares. Al usar una baja presión de inicio en la etapa donde se forman las gotas, se puede mantener baja la pérdida de gotas antes de alcanzar esta presión, lo que aumenta la eficiencia del aparato. El hecho de que todas las gotas se formen a lo largo de la misma trayectoria de vuelo también aumenta la eficacia. Preferiblemente, las gotas se inyectan directamente en el vacío, aunque puede ser deseable añadir una etapa a mayor presión para aumentar la estabilidad de la formación de gotas.

Con gotas de un tamaño de unos pocos micrómetros (p. ej., en el intervalo entre uno y diez micrómetros), las gotas se secan lo suficiente para lograr la formación de matriz (p. ej., cristalización) en milisegundos o incluso en microsegundos. Con una velocidad de 20 m/s, esto no impone restricciones severas en la longitud de la trayectoria de vuelo. Incluso se pueden usar velocidades más altas en un intervalo de 100-300 metros por segundo.

Se puede proporcionar una fuente de flujo de gas (no se muestra) adyacente al piezo resonador 16 para crear un chorro de gas a lo largo de la trayectoria de vuelo. Tal chorro puede ayudar a reducir la posibilidad de que se aglomeren gotas consecutivas.

El circuito control 17 controla el láser de pulso 18 para generar pulsos en sincronismo con las oscilaciones del piezo resonador 16, con una fase relativa para que los pulsos del láser de pulso 18 lleguen a la trayectoria de vuelo en los puntos de tiempo cuando las gotas del piezo resonador 16 pasan a través del rayo láser. Esto da como resultado la ionización de las partículas de las gotas. El espectrómetro de masas 19 analiza el espectro de masas de las partículas emergentes.

La sincronización de los pulsos de láser con las oscilaciones del piezo resonador 16 se puede realizar sincronizando los pulsos de láser con la señal de excitación del piezo resonador 16. Alternativamente, se puede usar un detector de gotas (no mostrado) para detectar gotas a lo largo de la trayectoria de vuelo en la cámara 15 y el láser de pulso 18 se puede activar por señales de dicho detector. Este detector también se puede configurar para medir la velocidad de las gotas, para predecir el tiempo de llegada de cada gota. Alternativamente, se puede asumir una velocidad predeterminada que se puede determinar experimentalmente.

Los espectros de masas se pueden recoger en un circuito control 17 o en un ordenador de medición y compararse con los espectros de referencia o partes de espectros de referencia o listas de biomarcadores para microorganismos conocidos para identificar el tipo de microorganismos en las gotas respectivas. En una realización de cribado simple, puede ser suficiente una comparación con un pequeño número de espectros de referencia. Se puede calcular un recuento de microorganismos para determinar una concentración de los microorganismos identificados comparando el recuento con un recuento general de gotas o con un recuento de gotas que contienen un microorganismo o célula de un tipo de referencia. En una realización más exploratoria, se puede realizar una comparación con un número mayor de espectrogramas de referencia para identificar una gama de tipos de microorganismos o tipos de células en una muestra.

La Figura 2 muestra una realización que usa el cribado previo de gotas. Se han añadido un láser adicional 20 y un detector de fluorescencia 22. Además, el láser 20 tiene una longitud de onda seleccionada para excitar la fluorescencia de los microorganismos en las gotas. Se puede usar, por ejemplo, una longitud de onda de 266 nm. El láser adicional 20 se dirige a una parte de la trayectoria de vuelo 24 de las gotas antes de que alcancen el punto de ionización. Se puede usar un láser de onda continua o un láser de pulso sincronizado para la formación de gotas. El detector de fluorescencia 22 se dirige de manera similar a la trayectoria de vuelo 24 para capturar la fluorescencia de una gota voladora después de la irradiación con un láser adicional 20. El detector de fluorescencia 22 está acoplado al circuito de control 17 que está configurado para hacer que el láser de pulso se dispare de manera condicional, solo en las gotas en las que se ha detectado fluorescencia indicativa de la presencia de un microorganismo. Además, se puede usar el láser adicional 20 para activar el disparo, es decir, para seleccionar el punto de tiempo de disparo. En otra realización, se pueden usar uno o más láseres para activar el disparo que usan puntos de tiempo y/o velocidades de gotas detectadas con uno o más láseres. Esto se puede hacer independientemente de si se usa un láser adicional 20.

En una realización adicional, se puede detectar fluorescencia en el conducto 11, antes de la separación del líquido en gotas en el piezo resonador 16. En este caso, el láser adicional y el detector de fluorescencia se dirigen al conducto 11 y el circuito de control 17 puede determinar la gota en la que se aislará el microorganismo a partir del tiempo de detección, la velocidad de flujo del piezo resonador 16 y la señal de excitación del piezo resonador 16. La detección de fluorescencia en el conducto 11 puede ayudar a prevenir que la cristalización de la matriz obstruya la detección de fluorescencia de los microorganismos.

La Figura 3 muestra una realización en donde el aparato comprende una fuente de ultrasonidos 30 dirigida a un receptor de muestra 10, o el conducto 11 entre el receptor de muestra 10 y la primera unidad de mezcla 12 y configurada para separar agrupamientos de microorganismos en microorganismos individuales. Además, la fuente de ultrasonidos 30 se puede usar para separar microorganismos de un transportador de muestra en el que se han recogido los microorganismos, como un bastoncillo de algodón o un trozo de papel de filtro.

Las técnicas para la separación por ultrasonidos de grupos de microorganismos son conocidas per se. La separación de grupos se puede usar para reducir el número de gotas en las que está presente más de un microorganismo a la vez. Aunque se muestra un ejemplo en donde la fuente de ultrasonidos 30 está dirigida al receptor de muestra 10, se debe apreciar que se pueden dirigir una o más fuentes de ultrasonido 30 a cualquier posición entre el receptor de muestra 10 y el piezo resonador 16 para separar los grupos. La separación de los grupos antes de la primera unidad de mezcla 12 tiene la ventaja de que se puede obtener una determinación de densidad más fiable y una dilución más homogénea.

En lugar de separar los grupos por medio de ultrasonidos, se pueden usar otras técnicas de separación, como la agitación en vórtice, que se conoce per se y que implica la creación de vórtices en el líquido, p. ej., agitando el líquido. Sin la separación de los grupos existe el riesgo de que algunas gotas puedan contener un grupo de microorganismos. En algunos casos, esto puede no ser un problema, por ejemplo, cuando los grupos son homogéneos o cuando no hay necesidad de distinguir entre diferentes tipos de organismos en un grupo.

La Figura 4a muestra esquemáticamente más detalles de un separador con piezo resonador 16. El conducto 11 termina en la abertura a través del piezo resonador 16, que se contrae periódicamente para lanzar gotas. Aunque se ha descrito una realización en la que se usa un piezo resonador 16 para separar la corriente de líquido en gotas, se debe apreciar que se pueden usar otras técnicas de formación de gotas. Por ejemplo, se puede usar una boquilla

dinámica de gas, que es conocida per se, en donde se abre el conducto 11 en un flujo de gas que actúa para separar la corriente de líquido en gotas cuando o después de que se inyecta la corriente de gas. La Figura 4b muestra un ejemplo de una configuración que se puede usar en donde se descarga el extremo del conducto 11 en un conducto más grande 50 en donde se suministra el flujo de gas. Por lo tanto, se pueden formar gotas después de inyectar la corriente de líquido en un entorno gaseoso. Preferiblemente, las velocidades de flujo de gas y líquido y el tamaño de apertura se establecen de manera que se obtenga un intervalo estrecho de tamaños de gotas ya que esto aumenta la eficiencia y simplifica el control necesario para garantizar que el láser de pulso 18 dispare en el momento necesario para impactar una gota.

En otra realización, se puede usar un mecanismo de separación de gotas similar al goteo de un grifo, en donde se hace pasar una corriente de líquido a través de un conducto hacia una abertura del conducto y las gotas se arrancan en vuelo desde la abertura. Se puede usar la gravedad, o un flujo de gas más allá de la abertura para arrancar gotas de la abertura. En esta realización, el tamaño de la gota se puede controlar por medios de selección del caudal de la corriente de líquido, diámetro y/o forma de la abertura y velocidad del flujo de gas. En otra realización, se puede usar una entrada de gas 54 en el conducto 11, como se muestra en la figura 4c para inyectar burbujas de gas a distancias regularmente separadas en la corriente de líquido a través del conducto 11. Se puede usar una válvula 56 en la entrada de gas 54 para formar las burbujas. Las burbujas separan la corriente en secciones antes de que la corriente llegue a la abertura del conducto 11, de modo que cada sección dará como resultado una respectiva gota cuando la corriente se ve obligada a salir de la abertura del conducto 11.

Como se describe, el aparato proporciona un proceso de identificación de microorganismos en donde una corriente de líquido que contiene microorganismos y material de matriz. La corriente líquida se ve dividida en gotas, preferiblemente en gotas monodispersas. Las gotas son suministradas en vuelo a lo largo de la trayectoria de vuelo. Estas gotas se secan al vacío durante el vuelo. Las partículas secas resultantes se ionizan para obtener un espectrograma de masas. Las partículas se analizan en vuelo. En la realización ilustrada, el líquido se diluye a un nivel de dilución en el que la mayoría de las gotas con microorganismos contienen solo un microorganismo.

Aunque se ha mostrado una realización específica de un aparato, se debe apreciar que este proceso se puede realizar con realizaciones modificadas del aparato. Por ejemplo, en lugar de usar los conductos 11, se puede usar un soporte de muestra transportable que se puede transportar a una unidad de mezcla de material de matriz y a una estación de formación de gotas. La mezcla de diluyente y la mezcla de material de matriz se puede realizar en una única unidad de mezcla 40, como se muestra en la figura 4, con una etapa de mezcla 42 para mezclar la muestra tanto con diluyente como con el material de matriz, simultáneamente o en diferentes intervalos de tiempo. Parte del transporte se puede realizar en conductos y otra parte se puede realizar con unidades de transporte. Se puede cambiar la secuencia de dilución y adición de material de matriz, o se puede dividir cualquier etapa de mezcla en una pluralidad de etapas de mezcla.

Aunque se han descrito a modo de ejemplo aplicaciones para microorganismos, se debe apreciar que la técnica se puede usar para identificar otros tipos de material biológico, como células, por ejemplo, células sanguíneas o tipos específicos de dichas células. La muestra puede contener una mezcla de diversos materiales y se pueden identificar una pluralidad de tipos de material a partir de la muestra combinando los resultados obtenidos de espectrogramas de masas de diferentes de gotas.

En una aplicación de cribado de admisión hospitalaria, se puede tomar una muestra de material biológico de un paciente, por ejemplo de saliva, o de cualquier membrana mucosa o una muestra de sangre o una muestra de orina o combinaciones de las mismas, y la muestra se puede procesar como se describe. Se pueden usar las identificaciones resultantes de microorganismos en gotas a partir de sus espectrogramas de masas, o un recuento de gotas que contienen un microorganismo con un espectrograma de masas que coincide con el espectrograma de masas de referencia de un microorganismo nocivo como un *Staphylococcus Aureus* con una resistencia antibiótica específica para decidir si aceptar o no al paciente para el tratamiento usual. Los pacientes con microorganismos nocivos se pueden redirigir para un tratamiento especial.

De manera similar, se pueden controlar los brotes de infecciones con microorganismos nocivos tomando muestras de una pluralidad de pacientes y procesando las muestras como se describe. En una realización, se pueden mezclar muestras de diferentes pacientes, por ejemplo, si se necesita la identificación de microorganismos nocivos en un grupo de personas, p. ej., en una sala de hospital, sin necesidad de seleccionar pacientes individuales.

En una aplicación diagnóstica, se puede tomar una muestra de material biológico de un paciente, y se puede procesar la muestra como se describe para detectar la infección con microorganismos específicos.

Aunque se ha descrito una realización con un láser de pulso, lo que evita la necesidad de suministrar energía suficiente para la ionización de forma continua, se debe apreciar que la naturaleza separada de las gotas puede permitir el uso de un láser de onda continua. En lugar de un láser, se pueden usar otros tipos de fuente de luz para proporcionar luz para ionizar al menos parte de una gota. Se puede usar, por ejemplo, luz UV o luz infrarroja. En lugar de la luz, se pueden considerar otros medios para ionizar, como el bombardeo de iones o incluso la irradiación con ultrasonido.

La Figura 5 muestra un aparato de identificación que comprende un depósito de muestra 50, un primer depósito de líquido transportador 520, una bomba 522, una primera etapa de mezcla 524, un fraccionador de flujo-campo de flujo 54, un detector de tamaño 540, una válvula de tres vías 542, un depósito de matriz 550, una segunda etapa de mezcla 552, un segundo depósito de líquido transportador 560, una tercera etapa de mezcla 562, un citómetro de flujo 57 y un formador de gotas 58. La bomba 522, la primera etapa de mezcla 524, el fraccionador de flujo-campo de flujo 54, la válvula de tres vías 542, la segunda etapa de mezcla 552, la tercera etapa de mezcla 562 y el formador de gotas 58 están acoplados en serie a lo largo de un canal de flujo de líquido. El primer depósito de líquido transportador 520 alimenta en una entrada de la bomba 522. El depósito de muestra 50 alimenta en una entrada de la primera etapa de mezcla 524. El detector de tamaño 540 está acoplado a una parte del canal de flujo de líquido corriente abajo del fraccionador de flujo-campo de flujo 54 y corriente arriba de la válvula de tres vías 542. El depósito de matriz 550 alimenta en una entrada de la segunda etapa de mezcla 552. El segundo depósito de líquido transportador 560 alimenta en una entrada de la tercera etapa de mezcla 562. El citómetro de flujo 57 se acopla a una parte del canal de flujo de líquido corriente debajo de la tercera etapa de mezcla 562 y corriente arriba del formador de gotas 58.

Aunque no se muestra, el aparato puede contener tampones para almacenar cantidades variables de líquidos en una o más posiciones a lo largo del canal de flujo de líquido, por ejemplo, entre la válvula de tres vías 542 y la segunda etapa de mezcla 552. Se pueden usar los tampones para reducir las variaciones en el caudal.

En funcionamiento, la bomba 522 bombea líquido transportador desde el primer depósito de líquido transportador 520 a través del canal de flujo. El agua se puede usar como líquido transportador, por ejemplo, con una adición de acetato de amonio. La primera etapa de mezcla 524 mezcla una cantidad pulsada de líquido de muestra en la corriente de líquido transportador durante un intervalo de tiempo de pulso. El fraccionador de flujo-campo de flujo 54 fracciona la corriente en fracciones sucesivas en el tiempo de acuerdo con el tamaño de partícula. El detector de tamaño 540 detecta un tamaño de las partículas en función del tiempo y controla la válvula de tres vías 542 para pasar el flujo a la segunda etapa de mezcla 552 o a una salida de desechos, dependiendo del tamaño detectado. La segunda etapa de mezcla 552 mezcla material de matriz MALDI del depósito de matriz 550 en la corriente.

Se puede usar mezcla continua. La tercera etapa de mezcla 562 mezcla líquido transportador adicional en la corriente. El citómetro de flujo 57 mide la densidad de microorganismos en la corriente. La velocidad de mezcla de la tercera etapa de mezcla 562 se controla dependiendo de la densidad medida. El formador de gotas 58 separa la corriente en partes sucesivas de la corriente y lanza las gotas, cada una formada a partir de una parte respectiva.

Preferiblemente, el canal de flujo está diseñado de modo que la corriente fluya desde la segunda etapa de mezcla 552 para bajar al formador 58 sin ningún reordenamiento axial sustancial. Es decir, se evitan grandes depósitos donde el líquido se puede acumular y mezclar en el canal de flujo. Como resultado, las partes en las que el formador de gotas 58 separa el líquido corresponden a secciones sucesivas de la corriente ya después de la segunda etapa de mezcla 552, o al menos después de la tercera etapa de mezcla 562. La dilución en la tercera etapa de mezcla 562 se realiza mezclando el líquido transportador en la corriente que fluye.

Se puede usar un bucle de retroalimentación para controlar la tercera etapa de mezcla 562, estando diseñado el bucle de retroalimentación para cambiar la velocidad de mezcla hacia arriba o hacia abajo según si la densidad medida "C" está por encima o por debajo de un valor objetivo preestablecido. Se puede usar un valor objetivo preestablecido CO que satisfaga $CO \cdot V = A$, donde V es el volumen de una parte en la que el formador de gotas 58 separa la corriente y A es un número inferior a dos, y más preferiblemente inferior a uno; por ejemplo, se puede usar un valor $A = 0,2$. Cuando la densidad cae tan bajo que permanece por debajo del valor objetivo predeterminado, incluso si no se añade líquido transportador, o se añade un mínimo predeterminado de líquido transportador, el control de la tercera etapa de mezcla 562 puede dejar de depender de la densidad.

En lugar del fraccionador de flujo-campo de flujo 54, se puede usar cualquier otro dispositivo de fraccionamiento que fraccione la corriente con un pulso de líquido de muestra en una corriente con tamaño de partícula que cambia gradualmente. Esto tiene la ventaja de que reduce la cantidad de material de tamaño relativamente pequeño de la muestra que podría obstruir la identificación de microorganismos cuando están presentes en las gotas. Además, tiene la ventaja de que la velocidad de mezcla en la tercera etapa de mezcla 562 se puede adaptar a tiempo para proporcionar diferencias de densidad de microorganismos entre diferentes fracciones de microorganismos. Por lo tanto, las gotas con un solo microorganismo se pueden comprobar más fácilmente para cada una de las fracciones. Esto puede ser difícil cuando las fracciones con una densidad muy diferente están presentes simultáneamente.

Se puede usar un fraccionador de flujo-campo de flujo 54 convencional. Dicha columna se describe, por ejemplo, en el artículo de Hookeun Lee et al., citado en lo anterior. Brevemente, dicho aparato usa una cinta delgada como canal abierto a través del cual fluye una corriente de líquido transportador con material de muestra. Surgen diferentes velocidades de flujo en función de la posición en el canal transversal a la dirección del flujo. Por medio de un campo externo, se dan diferentes distribuciones de densidad transversal para diferentes fracciones de partículas. Se puede usar un campo externo como un campo eléctrico, un gradiente de temperatura impuesto, gravedad, etc. La distribución de densidad surge de un equilibrio entre el efecto del campo y la difusión que contrarresta el gradiente de densidad. Como resultado emergerán diferentes fracciones a la salida del fraccionador de flujo-campo de flujo 54 separadas por el tiempo, dejando los microorganismos intactos.

El detector de tamaño 540 sirve para detectar el tamaño de las partículas de las fracciones emergentes. El detector de tamaño 540 se puede omitir cuando se usa un proceso de fraccionamiento de flujo-campo de flujo estrechamente controlado. En este caso, la válvula de tres vías 542 se puede controlar mediante un temporizador, por ejemplo, que define intervalos de tiempo para pasar líquido hacia la segunda etapa de mezcla 552 a retrasos predeterminados después de los pulsos del material de muestra. El detector de tamaño 540 se puede configurar para medir la dispersión de la luz como una medida de tamaño, pero se pueden usar otras técnicas como mediciones de conductividad o detección de fluorescencia.

El citómetro de flujo 57 puede comprender un detector de fluorescencia configurado para detectar picos temporales en fluorescencia en el líquido que pasa que son debidos a microorganismos. Se puede usar, por ejemplo, fluorescencia a una longitud de onda correspondiente al NADH. Se puede usar un recuento de dichos picos por unidad de tiempo como una señal de densidad para controlar la tercera etapa de mezcla 562. En una realización, se pueden usar las detecciones de microorganismos individuales del citómetro de flujo 57 para permitir el disparo por láser del láser de pulso (no se muestra), que dispara a una gota, que se desactiva cuando el citómetro de flujo 57 no detecta un microorganismo en la parte de la corriente de líquido a partir de la cual se formará la gota. Cuando la densidad de los microorganismos cae por debajo de un nivel en el que la tercera etapa de mezcla 562 mezcla el líquido transportador dependiendo de la densidad del organismo, se puede usar el control de disparo para mantener una espectroscopía de masas eficaz.

La Figura 6 muestra un aparato con una válvula adicional de tres vías 60 entre el citómetro de flujo 57 y el formador de gotas 58 con una entrada de control acoplada al citómetro de flujo 57. En funcionamiento, se usan detecciones de microorganismos individuales para controlar la válvula adicional de tres vías 60, haciéndola pasar líquido al formador de gotas 58 cuando se detecta un microorganismo y, si no, a una salida de desechos diferente. De esta forma, se minimiza el número de gotas inútiles. Cuando la densidad de los microorganismos cae por debajo de un nivel en el que la tercera etapa de mezcla 562 mezcla el líquido transportador dependiente de la densidad del organismo, se puede usar el control de la producción de desechos para mantener una espectroscopía de masas eficaz. En una realización, se usa el control "bajo demanda" del formador de gotas 58 para desencadenar la formación de gotas cuando el líquido no se alimenta a la salida de desechos. La figura 7 muestra un aparato en donde el citómetro de flujo 57 está ubicado corriente arriba de la tercera etapa de mezcla 562. Por lo tanto, se realiza un control de avance de alimentación de acuerdo con una relación predeterminada entre la densidad de los microorganismos detectados y velocidad de mezcla. Se puede usar la siguiente relación

$$F_{add} = N_{org} * V_{drop}/A - F_{in}$$

En esta memoria, F_{add} es la mezcla en el caudal del segundo depósito de líquido de transporte 560, N_{org} es la densidad entrante de microorganismos detectados por unidad de tiempo, V_{drop} es el volumen de la parte líquida a partir de la que se forma una gota y A es una densidad deseada, siendo A preferiblemente menos de uno, por ejemplo, $A = 0,2$. En las soluciones de retroalimentación de las figuras 5 y 6, esta relación se comprueba por retroalimentación. Se puede determinar la densidad contando los microorganismos detectados o a partir de la distancia de tiempo entre detecciones sucesivas. En una realización, la tercera etapa de mezcla 562 de la realización de la figura 7 se puede controlar dependiendo de la detección de microorganismos individuales, controlando la velocidad de mezcla dependiendo de la distancia de tiempo entre detecciones sucesivas de organismos, aumentando la cantidad de líquido transportador añadido cuando la distancia de tiempo disminuye.

La solución de alimentación de avance de la figura 7 tiene la ventaja de que hace posible proporcionar la detección a partir de muestras más pequeñas. La solución de alimentación de avance se puede combinar con el uso de una válvula adicional de tres vías 60 (no mostrada) o permitir el disparo. En este caso, el control puede ser estadístico, evitando disparar cuando solo un bajo porcentaje de gotas contiene microorganismos. Aunque se ha mostrado una realización en donde el citómetro de flujo 57 está ubicado entre la segunda y tercera etapa de mezcla 552, 562. Se debe apreciar que el citómetro de flujo 57 puede también estar localizado corriente arriba de la segunda etapa de mezcla 562. En este caso la densidad se mide antes de la adición del material de matriz MALDI. Cuando se diseña una segunda etapa de mezcla 562 para añadir material de matriz MALDI a una velocidad conocida, la densidad de los microorganismos en la corriente antes de la etapa de mezcla 562 se puede traducir en una densidad después de esta etapa. Para un mejor control se prefiere un citómetro de flujo 57 después de la segunda etapa de mezcla 562.

Se puede usar la medida de densidad del citómetro 57 de la figura 7 para controlar el disparo del láser y/o una válvula adicional de tres vías (no mostrado). La válvula adicional de tres vías puede estar localizada en una posición similar a la de la válvula de tres vías 60 en la figura 6, o entre el citómetro de flujo 57 y la tercera etapa de mezcla 552. En una realización, el detector de tamaño 54 se puede reemplazar por un citómetro que controla la válvula de tres vías 542 para que pase líquido a la segunda etapa de mezcla 552 hasta la detección de al menos un umbral de densidad de microorganismos. En este caso, este citómetro también se puede usar para controlar la dilución por la tercera etapa de mezcla 562. Pero, aunque se ha mostrado un único citómetro para múltiples propósitos, se debe apreciar que en lugar se pueden usar una pluralidad de citómetros, cada uno para implementar uno o grupos de estos propósitos respectivos.

En una realización, se puede usar un citómetro de flujo corriente arriba del formador de gotas 58 para controlar el disparo del láser de pulso 18 incluso sin medidas para controlar la dilución. Esto se puede usar, por ejemplo, cuando

se sabe que la densidad de los microorganismos nunca será demasiado alta. En otra realización, se puede usar un citómetro de flujo corriente arriba del formador de gotas 58 para controlar una válvula de tres vías para suministrar líquido al formador de gotas 58 selectivamente tras la detección de microorganismos o la detección de que una densidad de microorganismos supera un valor umbral. Esto se puede hacer incluso sin medidas de control de dilución. Se puede usar una combinación de control del disparo del láser y la válvula de tres vías.

Por lo tanto, se puede proporcionar un aparato para identificar material biológico en una muestra, comprendiendo el aparato

- un generador de corriente configurado para suministrar una corriente continua de un líquido en donde se han mezclado la muestra y el material de matriz de formación de cristal;

- un separador de porción de líquido configurado para separar la corriente en partes sucesivas de la corriente y suministrar gotas formadas a partir de dichas partes en vuelo a lo largo de una trayectoria de vuelo;

- una fuente de radiación dirigida a la trayectoria de vuelo y configurada para suministrar radiación para ionizar material a partir de las gotas;

- un espectrómetro de masas configurado para obtener espectrogramas de masa del material ionizado de cada una de las gotas individuales; y

- un citómetro localizado entre el generador de corriente y el separador de la porción de líquido y configurado para detectar microorganismos en la corriente, estando el citómetro acoplado a la fuente de radiación y/o al selector de trayectoria de flujo que permite la selección de la fuente de radiación y/o el control entre la dirección de la corriente al separador de la porción de líquido o, en cualquier caso, dependiente de la detección de microorganismos. De este modo se puede hacer que el aparato procese pequeñas muestras de microorganismos con mayor eficacia.

Aunque se ha descrito el uso de válvulas de tres vías para obtener un selector de trayectoria de flujo para alternar entre pasar un líquido para un procesamiento posterior y desperdiciar el líquido, se debe tener en cuenta que se pueden usar otros tipos de válvula para esto, como los colectores.

Se pueden usar una pluralidad de ramificaciones con fraccionadores de flujo-campo de flujo 54 en paralelo para manejar diferentes muestras. Cada ramificación puede contener los componentes que corresponden a aquellos hasta y que incluyen, por ejemplo, la válvula de tres vías 542. Se puede usar un colector de líquido para conectar estas ramificaciones a la entrada de la segunda etapa de mezcla 552, sucesivamente. Por lo tanto, se puede hacer un uso eficaz del aparato, incluso si el fraccionamiento del flujo-campo de flujo consume mucho tiempo.

Se proporciona un método para identificar material biológico en una muestra, el método comprende preparar un líquido que comprende la muestra y un material de matriz MALDI; generar una corriente continua de líquido; separar la corriente en partes sucesivas para formar gotas voladoras; ionizar material de las gotas durante el vuelo; y medir espectros de masas del material ionizado.

El material biológico comprende microorganismos. El método puede comprender diluir la muestra o el líquido hasta un nivel de dilución que corresponde a una concentración de menos de un microorganismo en promedio en un volumen de las partes individuales. Se puede medir el nivel de dilución y se puede controlar la dilución para que continúe hasta que el líquido se haya diluido a dicha concentración. Se puede aplicar una etapa de separación a la muestra o al líquido para separar de microorganismos en microorganismos individuales antes de la etapa de separación.

El líquido se puede separar en partes de volumen sustancialmente igual, por ejemplo, separando las partes sucesivas a intervalos regulares en dicha corriente. Las partes sucesivas de líquido se pueden lanzar al vuelo durante o después de separarlas de la corriente. Alternativamente, la corriente se puede lanzar en vuelo y la corriente se puede separar en las partes sucesivas mientras la corriente esté en vuelo. Las gotas se pueden secar en vuelo, al menos hasta un nivel de secado donde los cristales del material de la matriz se forman en vuelo antes de la etapa de ionización. Se puede aplicar un chorro de gas a lo largo de al menos parte de una trayectoria de las gotas en vuelo. Las gotas se pueden analizar en función de la fluorescencia antes de dicha ionización, y la ionización solamente de gotas con partes del líquido que se han detectado para producir al menos una intensidad de fluorescencia predeterminada.

Se proporciona un aparato para identificar material biológico en una muestra, el aparato comprende un mezclador configurado para preparar un líquido en donde se mezclan la muestra y el material de matriz formador de cristales; un generador de corriente configurado para suministrar una corriente continua del líquido; un separador de porción de líquido configurado para separar la corriente en partes y para suministrar gotas formadas a partir de dichas partes en vuelo a lo largo de una trayectoria de vuelo; una fuente de radiación dirigida a la trayectoria de vuelo y configurada para suministrar radiación para ionizar material a partir de las gotas y un espectrómetro de masas configurado para obtener espectrogramas de masas del material ionizado a partir de cada una de las gotas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar material biológico que comprende microorganismos en una muestra, el método que comprende:
 - preparar un líquido que comprende la muestra;
- 5
 - generar una corriente continua del líquido;
 - separar la corriente en sucesivas partes de la corriente para formar gotas voladoras (52);
 - ionizar material a partir de las gotas (52) mientras están en vuelo;
 - medir el espectro de masas a partir del material ionizado:caracterizado por
- 10
 - mezclar un material de matriz MALDI dentro de la corriente continua;
 - diluir el líquido a un nivel de dilución dependiente de una concentración medida de los microorganismos hasta un nivel de dilución que corresponde a una concentración C de microorganismos que satisface $C \cdot V < 1$, en donde V es un volumen por parte separada, estando realizada dicha dilución por líquido mezclador transportador dentro de la corriente continua.
- 15
 - 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende medir la concentración de los microorganismos en la corriente con un citómetro (57) y controlar dicha dilución dependiendo de un resultado de salida del citómetro.
 - 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha medida con el citómetro (57) en la corriente se realiza corriente arriba de dicha dilución de dicha corriente.
- 20
 - 4. Un método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones anteriores que comprende comparar dicha concentración medida con un valor umbral e inhabilitar dicha ionización cuando la concentración está por debajo del valor umbral.
 - 5. Un método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones anteriores en donde la concentración se mide con un citómetro (57) corriente abajo de dicha dilución y corriente arriba de la separación de la corriente en partes, el método que comprende la selección de las partes individuales para dicha ionización dependiendo de la detección de
- 25
 - microorganismos por el citómetro (57).
 - 6. Un método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones anteriores que comprende fraccionar el líquido en un flujo que comprende sucesivamente partículas de diferente tamaño.
 - 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en donde dicho fraccionamiento comprende aplicar el fraccionamiento de flujo-campo de flujo.
- 30
 - 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende separar el líquido en partes de volúmenes sustancialmente iguales.
 - 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende aplicar una etapa de separación de grupos a la muestra o al líquido para separar grupos de microorganismos en microorganismos individuales antes de la etapa de separación.
- 35
 - 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende controlar un caudal F de líquido transportador que diluye el líquido de acuerdo con $F = N_{org} + V_{drop}/A - F_{in}$, en donde N_{org} es la concentración entrante de microorganismos detectados por unidad de tiempo, V_{drop} es el volumen de la parte de líquido a partir de la cual se forma una gota, F_{in} es la velocidad del flujo entrante de la corriente y A es una concentración objetivo menor que uno.
- 40
 - 11. Un método para detectar bacterias con resistencia frente a un antibiótico, el método que comprende identificar las bacterias a partir de un espectro de masas obtenido por el método de la reivindicación 1.
 - 12. Un método para determinar si dar un tratamiento especial a un paciente en un hospital, el método que comprende
 - tomar una muestra de material biológico del paciente;
 - aislar al paciente cuando se muestra presente en la muestra un microorganismo predeterminado, caracterizado por
- 45
 - obtener un espectro de masas de una muestra por el método de la reivindicación 1;

- aislar al paciente cuando dicho espectrograma de masas coincide con el espectro de masas de dicho microorganismo predeterminado.

13. Un método para monitorizar los brotes de una infección con un microorganismo predeterminado en un hospital, el método que comprende

- 5 - tomar muestras de material biológico de al menos dos pacientes;
- preparar un líquido o líquidos que comprenden la muestra y/o muestras de los respectivos pacientes;
- para cada líquido, realizar las siguientes etapas:
- generar una corriente continua del líquido;
- mezclar material de matriz MALDI en la corriente continua;
- 10 - diluir el líquido a un nivel de dilución dependiente de una concentración medida de los microorganismos, hasta un nivel de dilución que corresponde a una concentración C de microorganismos que satisface $C \cdot V < 1$, en donde V es un volumen por parte separada, siendo realizada dicha dilución mediante mezcla del líquido transportador en la corriente continua;
- separar la corriente en partes sucesivas para formar gotas voladoras;
- 15 - ionizar material a partir de las gotas mientras están las gotas en vuelo;
- medir los espectros de masas para cada una de las gotas individuales;
- generar una alerta de infección cuando los espectros de masas de al menos parte de las gotas coinciden con el espectro de masas de un microorganismo predeterminado.
- 20 14. Un aparato para identificar material biológico que comprende microorganismos en una muestra, el aparato que comprende
- un generador de corriente (522) configurado para suministrar una corriente continua de un líquido que comprende la muestra;
- una primera unidad de mezcla (552) configurada para mezclar un material de matriz MALDI en la corriente continua;
- 25 - una segunda unidad de mezcla configurada para mezclar el líquido transportador en la corriente continua, la segunda unidad de mezcla que comprende un mezclador (562) y un detector (57) para medir una concentración de microorganismos, controlando un nivel de dilución del mezclador dependiendo de una concentración medida de los microorganismos a un nivel de dilución que corresponde a una concentración C de microorganismos que satisface $C \cdot V < 1$, en donde V es un volumen por parte separada;
- 30 - un separador de porción de líquido (58) configurado para separar la corriente en partes sucesivas de la corriente y para suministrar gotas (52) formadas a partir de dichas partes en vuelo a lo largo de una trayectoria de vuelo;
- una fuente de radiación (18) dirigida a la trayectoria de vuelo y configurada para suministrar radiación para ionizar material a partir de las gotas (52);
- un espectrómetro de masas (19) configurado para obtener espectrogramas de masas del material ionizado a partir de las gotas individuales (52).









