

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 592**

51 Int. Cl.:

F24F 3/00 (2006.01)

C12Q 1/6888 (2008.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2016 PCT/US2016/035311**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16196660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2016 E 16730597 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3303628**

54 Título: **Detección de agentes infecciosos a partir de polvo de aire ambiental**

30 Prioridad:

01.06.2015 US 201562169438 P

18.01.2016 US 201662280057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2024

73 Titular/es:

**CHARLES RIVER LABORATORIES
INTERNATIONAL, INC. (100.0%)**

**251 Ballardvale Street
Wilmington, Massachusetts 01887, US**

72 Inventor/es:

**HENDERSON, KENNETH S.;
COIRO, JOHN M.;
BILECKI, BRIAN M. y
SCHUPSKY, THOMAS P.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 959 592 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

Detección de agentes infecciosos a partir de polvo de aire ambiental

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Un requisito en la investigación biomédica es que los animales en estudio, habitualmente ratones, se monitoreen para confirmar que están libres de infección con patógenos específicos. En un ejemplo, los patógenos pueden interferir con la investigación al modular las respuestas experimentales y contaminar los productos biológicos, incluso si rara vez producen enfermedades. En otro ejemplo, se necesita monitoreo para preparar reportes de salud actuales para facilitar el envío hacia y desde las instituciones colaboradoras. En un ejemplo adicional, los órganos institucionales y/o de gobierno a menudo requieren que se realice un monitoreo periódico.

A fin de eliminar y entonces excluir los patógenos, los animales de estudio habitualmente se vuelven a derivar o se curan de la infección y se alojan detrás de barreras a nivel de habitación o jaula, respectivamente. Estos sistemas de jaula de microaislamiento se han adoptado ampliamente para mantener y poner en cuarentena a animales como ratones y ratas debido a que la barrera a nivel de jaula que proporcionan ha demostrado ser muy efectiva para excluir e impedir la propagación de agentes adventicios. Sin embargo, no se puede garantizar que ninguna barrera sea 100% efectiva. Por lo tanto, el monitoreo de salud de rutina (HM) sigue siendo necesario en entornos de microaislamiento para verificar el estado libre de patógenos específicos (SPF) de las colonias de cría e investigación y los animales importados en cuarentena.

Como los animales de estudio (por ejemplo, roedores de colonias de investigación) rara vez están disponibles para sangrarse o someterse a eutanasia por HM convencional, habitualmente se monitorean indirectamente a través del uso de centinelas de lecho sucio (SBS). Usando un enfoque de lecho sucio, los animales de centinela se alojan en una pluralidad de jaulas separadas de los animales de estudio y los cambios regulares de lecho sucio agrupados de las jaulas de los animales de estudio se suministran a las jaulas centinelas. Con el paso del tiempo, se espera que los agentes infecciosos transportados por los animales de estudio se transfieran al lecho agrupado y entonces a los animales de centinela. Por lo tanto, la examinación periódica de los centinelas de lecho sucio (por ejemplo, patología, parasitología, bacteriología, serología, etc.) proporciona un monitoreo indirecto de la salud de los animales de estudio.

Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado la dependencia de los centinelas de lecho sucio para el monitoreo de salud rutinario.

Henderson et al., J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 2013, 52(6):763-772 se refiere a un arreglo de alta densidad de ensayos de PCR en tiempo real para agentes infecciosos de roedores comúnmente reportados, para probar ratones índice infectados naturalmente y ratones de centinela expuestos por contacto y transferencia de lecho sucio.

Jensen et al., J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 2013, 52(1):28-33 se refiere a las pruebas de PCR del sistema de escape de un sistema de introducción en jaula ventilado para detectar ácaros de piel murina.

WO2005017181A2 se refiere a métodos para detectar la presencia o cantidad de un polinucleótido diana en una muestra, mezclándolo con un análogo de ácido nucleico que es complementario a una secuencia de ácido nucleico diana del polinucleótido diana, y un tinte, y comparándolo con una mezcla de referencia.

WO2007083147A2 se refiere a métodos y aparatos para pruebas de alto rendimiento de muestras biológicas que pueden o pueden no comprender microorganismos, utilizando un panel de multiplexación de diagnóstico diseñado para la identificación simultánea de una pluralidad de microorganismos potenciales que pueden estar presentes en la muestra biológica.

US2012045752A1 se refiere a un dispositivo de recolección de biopartículas y un sistema de recolección de aerosol, que utiliza una pluralidad de fibras formadas en una estera de fibra para la recolección de biopartículas y partículas de aerosol saturadas.

Se reconoce que el cambio a jaulas microaisladoras ha sido beneficioso para limitar la transmisión de patógenos, pero presenta un entorno deficiente para el monitoreo de diagnóstico. En particular, muchos agentes se transmiten de manera ineficiente, o no se transmiten en absoluto, a los animales de centinela de los animales de estudio a través del lecho sucio. Por lo tanto, a medida que la prevalencia de la infección se reduce dentro de la jaula de microaislante, mayor es el riesgo de que la dosis de patógeno en el lecho combinado sea insuficiente para infectar a los animales de centinela.

Por al menos estas razones, existe una necesidad continua de nuevos sistemas y métodos para monitorear animales de estudio en entornos de jaulas de microaislante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se describe en las reivindicaciones anexas. En una modalidad, se proporciona un método para detectar patógenos. El método incluye recibir una muestra de prueba que incluye polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire dentro de un pleno de escape de un estante de jaula ventilado individualmente (IVR) por medio de recolección de filtración de aire, donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape durante la captura de la muestra de prueba. El método incluye además aislar una pluralidad de ácidos nucleicos de la muestra de prueba, donde la pluralidad de ácidos nucleicos es representativa de uno o más patógenos, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos, y analizar los ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de un patógeno unido a la muestra de prueba.

En modalidades adicionales, el método incluye uno o más de los siguientes, en cualquier combinación.

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye al menos uno de amplificación isotérmica mediada por bucle y reacción en cadena de polimerasa (PCR).

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye PCR seleccionada del grupo que consta de PCR de punto final y PCR en tiempo real.

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye extraer una muestra de ARN de la muestra de prueba y transcribir de forma inversa la muestra de ARN extraída en una muestra de ADNc, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye amplificar la muestra de ADNc por PCR en tiempo real, y analizar los ácidos nucleicos amplificados incluye medir un valor de Ct de la muestra de ADNc amplificada.

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye extraer una muestra de ADN de la muestra de prueba, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye amplificar la muestra de ADN mediante PCR en tiempo real, y analizar los ácidos nucleicos amplificados incluye medir un valor de Ct de la muestra de ADN amplificada.

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye PCR y el análisis de los ácidos nucleicos amplificados incluye análisis de tiempo de vuelo de productos de PCR.

En una modalidad del método, la muestra de prueba incluye polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire durante un período de tiempo de al menos 2 semanas.

En una modalidad del método, el IVR incluye además al menos una jaula que aloja un animal de prueba.

Como se describe en la presente, la muestra de prueba incluye además al menos uno de los gránulos fecales obtenidos del animal de prueba, material biológico obtenido de un hisopo oral del animal de prueba, material biológico obtenido de un hisopo corporal del animal de prueba, y tejido del animal de prueba.

En una modalidad del método, el uno o más patógenos se seleccionan del grupo que consta de: *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Spironucleus spp.*, Norovirus murino, *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp.* beta-hemolítico

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye al menos uno de aislamiento magnético, aislamiento de ácido nucleico basado en columna, métodos de extracción orgánica, y lisis alcalina.

En una modalidad del método, el IVR no incluye una jaula que aloja un animal centinela.

En una modalidad del método, el medio de recolección incluye un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.

En una modalidad del método, el medio de recolección posee una eficiencia seleccionada dentro del intervalo entre 5 % y 40 %.

En una modalidad del método, el medio de recolección es un filtro graduado.

En el método, el ángulo del medio de recolección durante la captura de la muestra de prueba se selecciona del intervalo de 15° a 25° con respecto a la dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape.

En otra modalidad, se proporciona un método para detectar patógenos unidos al polvo de aire ambiental. El método incluye recibir una muestra de prueba que incluye polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire que pasa a través de un recinto por medio de recolección de filtración de aire dentro de un pleno de escape en comunicación con el recinto, en donde el polvo de aire ambiental se libera por agitación de lecho sucio por un animal de prueba, el recinto que incluye una cámara que contiene una jaula para animales en comunicación para fluidos con el flujo de aire y el polvo de aire ambiental liberado por agitación del lecho sucio del animal de prueba colocado dentro de la jaula para animales, y en

donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección de flujo de aire dentro del pleno de escape. El método incluye además aislar una pluralidad de ácidos nucleicos de la muestra de prueba, donde la pluralidad de ácidos nucleicos es representativa de uno o más patógenos, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos, y analizar los ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de un patógeno.

Modalidades adicionales del método pueden incluir uno o más de los siguientes, en cualquier combinación.

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye al menos uno de amplificación isotérmica mediada por bucle y reacción en cadena de polimerasa (PCR).

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye PCR seleccionada del grupo que consta de PCR de punto final y PCR en tiempo real.

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye extraer una muestra de ARN de la muestra de prueba y transcribir de forma inversa la muestra de ARN extraída en una muestra de ADNc, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye amplificar la muestra de ADNc por PCR en tiempo real, y analizar los ácidos nucleicos amplificados incluye medir un valor de Ct de la muestra de ADNc amplificada.

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye extraer una muestra de ADN de la muestra de prueba, amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye amplificar la muestra de ADN mediante PCR en tiempo real, y analizar los ácidos nucleicos amplificados incluye medir un valor de Ct de la muestra de ADN amplificada.

En una modalidad del método, la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos incluye PCR y el análisis de los ácidos nucleicos amplificados incluye análisis de tiempo de vuelo de productos de PCR.

En una modalidad del método, la muestra de prueba incluye polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire durante un período de tiempo de al menos 2 semanas.

En el método, el polvo de aire ambiental se libera por agitación del lecho sucio por el animal de prueba.

En una modalidad del método, el polvo de aire ambiental se libera por un dispositivo de accionamiento en comunicación mecánica con el recinto.

En una modalidad del método, el recinto no contiene un animal durante la captura del polvo de aire ambiental.

Como se describe en la presente, la muestra de prueba incluye además al menos uno de los gránulos fecales obtenidos del animal de prueba, material biológico obtenido de un hisopo oral del animal de prueba, material biológico obtenido de un hisopo corporal del animal de prueba, y tejido del animal de prueba.

En una modalidad del método, el uno o más patógenos se seleccionan del grupo que consta de: *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Spironucleus spp.*, Norovirus murino, *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp. beta-hemolítico*

En una modalidad del método, aislar la pluralidad de ácidos nucleicos incluye al menos uno de aislamiento magnético, aislamiento de ácido nucleico basado en columna, métodos de extracción orgánica, y lisis alcalina.

En una modalidad del método, el medio de recolección incluye un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.

En una modalidad del método, el medio de recolección posee una eficiencia seleccionada dentro del intervalo entre 5 % y 40 %.

En una modalidad del método, el medio de recolección es un filtro graduado.

En una modalidad adicional, se proporciona un sistema para recolectar polvo de aire ambiental generado dentro de un sistema de jaula para animales de estudio. El sistema incluye un recinto sellable de manera reversible. El recinto incluye una cámara adaptada para recibir una jaula para alojar un animal, la jaula que está en comunicación fluida con la cámara, una entrada de aire acoplable con un suministro de aire, y un retorno de aire acoplable con una fuente de vacío, donde una porción de un flujo de aire suministrado dirigido a través de la cámara, desde la entrada de aire al retorno de aire, pasa a través de al menos una porción de la jaula cuando se recibe en la cámara y es suficiente para transportar una porción de polvo de aire ambiental contenido dentro de la jaula recibida al retorno de aire. El sistema incluye además un dispositivo de accionamiento en comunicación mecánica con el recinto, el dispositivo de accionamiento operable para agitar los contenidos de la jaula cuando se reciben dentro de la cámara, y medio de recolección de filtración de aire adecuado para capturar al menos una porción del polvo de aire ambiental transportado por un flujo de aire dirigido a través

de la cámara, en donde el medio de recolección de filtración de aire se disponen dentro de un pleno de escape en comunicación para fluidos con y entre la cámara y la fuente de vacío, y en donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección de flujo de aire dentro del pleno de escape.

5

Las modalidades del sistema pueden incluir uno o más de los siguientes, en cualquier combinación.

En una modalidad del sistema, el medio de recolección se coloca con respecto al recinto tal que al menos una porción del flujo de aire incida en el medio de recolección después de pasar a través de la jaula.

10

En una modalidad del sistema, el medio de recolección se coloca dentro del recinto y fuera de la jaula.

En una modalidad del sistema, el medio de recolección se coloca con respecto al recinto tal que al menos una porción del flujo de aire incide en el medio de recolección después del pasaje a través del retorno de aire.

15

Como se describe en la presente, al menos una porción del medio de recolección se coloca en una pared de la jaula.

Como se describe en la presente, al menos una porción del medio de recolección se suspende dentro de la jaula.

20

En una modalidad del método, el medio de recolección incluye un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.

En una modalidad del sistema, el dispositivo de accionamiento se puede operar para mover de manera reversible el recinto al menos uno de a manera de traslación y rotacionalmente con respecto a una posición inicial.

25

En una modalidad del sistema, el dispositivo de accionamiento es un dispositivo ultrasónico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las modalidades, como se ilustra en las figuras anexas en las que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes de principio a fin de las diferentes vistas. Las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de las modalidades.

35

La figura 1 es un diagrama de flujo esquemático que ilustra una modalidad de un método para recolectar y analizar polvo de aire ambiental (EAD) de un estante de jaula ventilado individualmente (IVR) para la identificación de patógenos contenidos en el mismo;

40

La figura 2 es una ilustración esquemática de la colocación de una pluralidad de medios de recolección de EAD dentro de un entorno de IVR;

La figura 3A es una ilustración esquemática de la colocación de una pluralidad de medios de recolección de EAD dentro de un entorno de IVR;

45

La figura 3B es una ilustración esquemática de una modalidad de una jaula que incluye un medio de recolección de EAD adicional colocado en la jaula para usarse en la recolección de EAD de la jaula dentro de un entorno de IVR;

50

Las figuras 4A, 4B y 4C ilustran modalidades de un retenedor de medio de recolección de EAD para usarse dentro del entorno de IVR de la figura 3A;

La figura 4D es una fotografía que ilustra la colocación de un medio de recolección de EAD en un pleno de escape vertical del IVR;

55

La figura 4E es una fotografía que ilustra la colocación de un medio de recolección de EAD adicional adyacente a un filtro pre-HEPA en comunicación para fluidos con el IVR;

Las figuras 5A, 5B, y 5C ilustran una segunda modalidad de un retenedor de medios de recolección de EAD para usarse dentro del entorno de IVR de la figura 3A;

60

Las figuras 6A y 6B son ilustraciones esquemáticas de modalidades de medios de recolección de EAD;

Las figuras 7A y 7B son fotografías que ilustran ubicaciones de las cuales se recolectan muestras de EAD por hisopo para su análisis comparativo; (A) pleno de escape horizontal; (B) manguera de pleno de escape;

65

Las figuras 8A, 8B, 8C y 8D son gráficas que comparan la copia estimada de patógenos detectados por EAD recolectados del medio de recolección de EAD e hisopos; y

5 La figura 9 es una ilustración esquemática de una modalidad de un sistema de recolección de EAD configurado para la operación independientemente de un estante de jaula ventilado individualmente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Las modalidades de la presente divulgación se refieren a sistemas y métodos para la recolección y análisis de polvo de aire ambiental (EAD). En ciertas modalidades, los sistemas y métodos se pueden emplear en combinación con jaula de microaislante, tal como jaulas de microaislante estáticas y jaulas ventiladas individualmente (IVC) montadas en un estante. En modalidades alternativas, los sistemas y métodos se pueden emplear en combinación con estantes no de IVC (por ejemplo, estantes de jaula abiertos o abiertos donde no hay flujo de aire para acomodar la recolección de EAD).

15 Las moléculas patógenas, ya sean enteras o fragmentos de un todo, son capaces de unirse al polvo de aire. Este polvo de aire, a su vez, se puede suspender en un flujo de aire y moverse de una ubicación a otra. Por lo tanto, el EAD recolectado del flujo de aire que pasa a través de un entorno rico en patógenos se puede analizar para detectar la presencia de estos patógenos dentro del entorno de jaula.

20 En una modalidad, un método para detectar patógenos portados por polvo de aire ambiental incluye la recolección de una muestra de prueba que incluye EAD, aislamiento de una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) representativos de uno o más agentes infecciosos de la muestra de prueba, transcripción inversa opcional de ARN a ADNc si los ácidos nucleicos aislados contienen ARN, amplificación del ADNc y/o ADN (por ejemplo, por reacción en cadena de polimerasa (PCR)), e interpretación de ensayo. Como se divulga en la presente, la muestra de prueba puede
25 incluir material biológico distinto al capturado por la muestra de EAD recolectada (por ejemplo, gránulos fecales, hisopos corporales, hisopos orales, tejido, etc.) para mejorar la detección de organismos con bajo número de copias. En estas circunstancias, el preprocesamiento de la muestra sin EAD se puede realizar antes del coaislamiento de ácido nucleico con la muestra de EAD.

30 La muestra de EAD se recolecta de un entorno diana, tal como un estante de jaula ventilado individualmente (IVR). En un IVR, se suministra un flujo de aire estéril a un primer extremo del estante y se dirige a través de las jaulas del estante (por ejemplo, horizontalmente) a un segundo extremo opuesto del estante. El EAD, y los patógenos unidos al mismo, son transportados por el flujo de aire desde sus respectivas jaulas fuera del estante. Una pluralidad de medios de recolección de EAD, adecuados para capturar al menos una porción del EAD, se colocan en la ruta de flujo de aire. Por lo tanto,
35 durante el uso del estante ventilado, la pluralidad de medios de recolección de EAD incide en al menos una porción del flujo de aire, recolectando EAD y patógenos unidos de las jaulas.

Un medio de recolección de EAD se coloca dentro de un canal de escape que dirige el flujo de aire de escape lejos de las jaulas. En otra modalidad, un medio de recolección de EAD adicional se coloca sobre, adyacente, y/o dentro de una o
40 más jaulas.

En una modalidad adicional, un método para detectar patógenos transportados por el polvo de aire ambiental no incluye la recolección de EAD dentro de un sistema de estante de jaula ventilado individualmente (IVR). En su lugar, el EAD se recolecta del lecho sucio fuera de un IVR (por ejemplo, lecho sucio por un animal de prueba). Por ejemplo, en una
45 modalidad, el método incluye recolectar EAD de un recinto sellable de manera reversible que aloja una jaula para animales que contiene lecho sucio. El recinto incluye una cámara adaptada para recibir la jaula para animales, una toma de aire acoplable con un suministro de aire, y un retorno de aire acoplable con una fuente de vacío. En uso, se proporciona un flujo de aire a través del recinto, desde la toma de aire hasta el retorno de aire. El lecho sucio se agita para liberar el polvo que contiene patógenos en el aire dentro de la jaula. En el método, el lecho se agita por un animal colocado dentro de la
50 jaula (por ejemplo, el animal de prueba). En otra modalidad, el recinto está en comunicación con un dispositivo de accionamiento que agita la jaula. El EAD liberado y los patógenos unidos se portan por el flujo de aire fuera de la jaula.

La pluralidad de medios de recolección de EAD se colocan a fin de incidir en al menos una porción del flujo de aire, lo que permite la recolección de EAD y patógenos unidos. En el método, el medio de recolección de EAD se coloca dentro de
55 un pleno de escape. En una modalidad, un medio de recolección de EAD se monta fuera del recinto, dentro de un canal de escape que encamina el flujo de aire de escape lejos del recinto. En otra modalidad, un dispositivo de recolección de EAD adicional se monta en, adyacente a, y/o dentro de la jaula alojada dentro de la cámara de recinto.

El EAD capturado por el medio de recolección se puede analizar posteriormente para identificar la presencia de patógenos seleccionados. Este análisis de EAD se puede realizar por técnicas que incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de polimerasa (PCR) como se indica anteriormente y se analiza en mayor detalle a continuación.

En particular, las modalidades de los sistemas y métodos descritos se pueden emplear para muestrear patógenos en el
65 aire unidos al polvo del aire del entorno de los animales de estudio directamente, en lugar de requerir el uso de animales de centinela. Beneficiosamente, la eliminación del uso de animales de centinela evita la cría de centinelas y la necesidad de transferencias semanales de camas, además de ahorrar espacio de estante. Además, como se muestra en mayor

detalle a continuación, las modalidades de los métodos divulgados son capaces de detectar agentes infecciosos que no se transfieren de manera eficiente a los centinelas de lecho, así como aquellos que se transfieren de manera eficiente a los centinelas de lecho.

5 Las modalidades de la divulgación se describirán ahora con respecto a las figuras, comenzando con las figuras 1 y 2. La figura 1 es un diagrama de flujo de una modalidad de un método 100 para recolectar y detectar patógenos portados por el polvo de aire ambiental (EAD). Como se analiza en detalle a continuación, el método 100 incluye recibir una muestra de prueba que incluye polvo de aire ambiental en la operación 102, aislar una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) representativos de uno o más agentes infecciosos de la muestra de EAD en la operación 104, transcripción inversa opcional de ARN a ADNc si los ácidos nucleicos aislados contienen ARN en la operación 106, amplificación de ADNc y/o ADN en la operación 110 (por ejemplo, por reacción en cadena de polimerasa (PCR)), e interpretación de ensayo en la operación 112. En ciertas circunstancias, el método 100 puede incluir opcionalmente el preprocesamiento de muestra en la operación 114.

15 La figura 2 es una ilustración esquemática de una modalidad de un entorno de jaula de microaislante 200 del que se recolecta el EAD recibido. Con el propósito de la discusión, las modalidades de la divulgación se describirán en el contexto de un estante de jaula ventilado individualmente (IVR) 202 como el entorno de jaula de microaislante 200. Sin embargo, se puede entender que las modalidades divulgadas se pueden emplear con cualquier jaula de microaislante sin límite.

20 El IVR 202 incluye una pluralidad de jaulas 208 para alojar animales (por ejemplo, roedores) en una disposición seleccionada (por ejemplo, un arreglo que tiene filas y columnas en general alineadas). El entorno de jaula 200 incluye además un sistema de ventilación 204 en comunicación para fluidos con el IVR 202 mediante una red de flujo de aire 206. El sistema de ventilación 204 incluye una unidad de tratamiento de aire 210 que proporciona aire de suministro acondicionado estéril 212 a una toma de aire 214 del IVR 202 y recibe aire de escape 216 (por ejemplo, aire que incluye polvo y moléculas de patógeno unidas) de un retorno de aire 220 del IVR 202. En el IVR 202, el aire de suministro 212 se distribuye a diferentes ubicaciones (por ejemplo, diferentes filas y/o columnas) y fluye a través de cada jaula 208. Este flujo de aire dentro del IVR 202, conocido como flujo de aire de IVR 222, es suficiente para transportar al menos una porción de EAD desde las respectivas ubicaciones de la jaula a través del retorno de aire 220. Desde el retorno de aire 220, el flujo de aire que incluye el EAD viaja a la unidad de tratamiento de aire 210 y se conoce como aire de escape 216 en la presente.

La modalidad de la figura 2 se ilustra con un sistema de ventilación cerrado, donde el aire de escape 216 se reacondiciona (por ejemplo, a una temperatura, presión, esterilidad, etc. seleccionadas) por la unidad de tratamiento de aire 210 y posteriormente se proporciona al IVR 202 como el aire de suministro 212. Sin embargo, en modalidades alternativas, no mostradas, el sistema de ventilación puede ser un sistema abierto, donde el suministro de aire no se proporciona desde el escape de aire reacondicionado, sino que se proporciona desde una fuente separada.

35 Se proporciona además una pluralidad de medios de recolección de EAD 224 (por ejemplo, 224a, 224b) para capturar una porción de EAD dentro del IVR 202, en tanto que se permite que el aire de suministro 212, el flujo de aire de IVR 222, y el aire de escape 216 se muevan a través del IVR 202 sustancialmente sin obstáculos. El EAD capturado se puede retener en la superficie del medio de recolección de EAD 224, la mayor parte del medio de recolección de EAD 224, y/o dentro de una cámara de contención dedicada, con base en la configuración del medio de recolección de EAD 224. El medio de recolección de EAD de ejemplo 224 pueden incluir, pero no se limitan a, filtros mecánicos, filtros químicos, depuradores húmedos, filtros electrostáticos, y otros dispositivos de filtración adecuados para remover el polvo del aire, sin límite.

Cada medio de recolección de EAD 224 se puede seleccionar independientemente para capturar EAD que tenga un tamaño (por ejemplo, diámetro, área transversal u otra dimensión seleccionada) aproximadamente mayor que un valor seleccionado. En otras modalidades, el medio de recolección de EAD 224 se puede clasificar (por ejemplo, un filtro clasificado), con regiones espaciales seleccionadas para capturar EAD de diferentes tamaños. Estas zonas pueden variar continuamente o de manera discontinua dentro de la extensión espacial del medio de recolección de EAD 224. En ciertas modalidades, el medio de recolección de EAD 224 se puede seleccionar para capturar partículas de polvo que tienen un tamaño que varía de aproximadamente 0.1 nm a aproximadamente 10 mm. En modalidades adicionales, el medio de recolección de EAD 224 puede poseer eficiencia seleccionada dentro del intervalo entre aproximadamente 5% a aproximadamente 40% para el intervalo de tamaño seleccionado. En ciertas modalidades, la eficiencia del medio de recolección de EAD 224 puede ser de aproximadamente 30% para el intervalo de tamaño seleccionado. Se puede encontrar una discusión adicional del medio de recolección de EAD 224 en la Solicitud Provisional de Estados Unidos de América Núm. 62/280,057, presentada el 18 de enero de 2016 y titulada "Método y Sistema para Monitorear la Impureza de Flujo de Aire".

60 La posición del medio de recolección de EAD 224 se puede variar, dependiendo de la configuración del IVR 202, pero una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección de flujo de aire dentro del pleno de escape durante la captura de la muestra de prueba. Por ejemplo, como se ilustra en la figura 2, uno o más medios de recolección de EAD 224a se colocan dentro de una porción de la red de flujo de aire 206 para capturar EAD del aire de escape 216. Uno o más medios de recolección de EAD adicionales 224b se pueden colocar en o dentro de una o más jaulas seleccionadas 208 para capturar EAD del flujo de aire de IVR 222. En

modalidades adicionales, al menos un medio de recolección de EAD 224 se puede colocar para capturar EAD tanto del aire de escape 216 como del flujo de aire de IVR 222.

Independientemente de la posición, cada uno del medio de recolección de EAD 224 se mantiene en su lugar durante un tiempo seleccionado para capturar el EAD en el mismo. En ciertas modalidades, la duración de tiempo seleccionada puede ser un mínimo de 2 semanas. En modalidades adicionales, la duración de tiempo seleccionada puede ser de 3-4 meses. En modalidades adicionales, la duración de tiempo seleccionada puede ser de un año o más.

A fin de mantener una ventilación suficiente dentro del IVR 202, el medio de recolección de EAD 224 se puede desplegar adicionalmente de una manera que no interfiera sustancialmente con el flujo de aire dentro del sistema de ventilación 204 (por ejemplo, aire de suministro 212, flujo de aire de IVR 222 y/o aire de escape 216). Por ejemplo, como se analiza en mayor detalle a continuación con respecto a las figuras 3 y 4, se puede entender que el medio de recolección de EAD 224 no interfiere sustancialmente con el flujo de aire cuando se satisface al menos una de las siguientes condiciones:

- (i) un motor de soplador del sistema de ventilación 204 no exhibe un cambio en las RPM (velocidad) debido a la presión incrementada provocada por el medio de recolección de EAD 322 (por ejemplo, 322A, 322B, 322C) o la presencia de un retenedor de medios de recolección de EAD 400 (figuras 4A-4C) que mantiene el medio de recolección de EAD 322 (por ejemplo, 322A) dentro de un pleno de escape vertical 316 (figura 4D);
- (ii) una presión dentro de una o más jaulas 308 (figura 3A) varía en menos de o igual a $\pm 5\%$ debido al flujo de aire reducido provocado por una restricción en el pleno de escape vertical 316 debido a la presencia del medio de recolección de EAD 322a y/o el retenedor de medios de recolección de EAD 400 en comparación a la presión dentro de la una o más jaulas 308 ausentes del medio de recolección de EAD 322a y/o el retenedor de medios de recolección de EAD 400 dentro del pleno de escape vertical 316;
- (iii) una presión dentro del pleno de escape vertical 316 (por ejemplo, en un collar de escape o extremo terminal 450 del pleno de escape vertical 316) varía por menos de o igual a $\pm 10\%$ debido a la presencia del medio de recolección de EAD 322a y/o el retenedor de medios de recolección de EAD 400 dentro del pleno de escape vertical 316 en comparación a la presión dentro del pleno de escape vertical 316 ausente del medio de recolección de EAD 322a y/o el retenedor de medios de recolección de EAD 400.

En modalidades adicionales, la configuración del medio de recolección de EAD 224 y/o la colocación del medio de recolección de EAD 224 dentro del IVR 202 facilita el mantenimiento de ventilación suficiente dentro del IVR 202. En una modalidad, las respectivas dimensiones del medio de recolección de EAD 224 pueden ser menores que (por ejemplo, 30% menos, 40% menos, 50% menos, 60% menos, 70% menos, etc.) que las dimensiones correspondientes de un pasaje de flujo de aire en el que el medio de recolección de EAD 224 se coloca o está adyacente a (por ejemplo, pleno de escape vertical 316, filtro pre-HEPA 450, etc.). El medio de recolección de EAD 224 se coloca tal que el plano del medio de recolección de EAD 224 se oriente en un ángulo agudo con respecto a una dirección de flujo de aire (por ejemplo, flujo de aire vertical dentro del pleno de escape vertical 316) durante la captura de la muestra de prueba. El ángulo agudo se selecciona dentro del intervalo de 15° a 25° (por ejemplo, 20°) con respecto a la dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape vertical 316.

Después de la recolección de EAD por captura usando el medio de recolección de EAD 224, al menos una porción del EAD recolectado se analiza para detectar la presencia o ausencia de un patógeno en las operaciones 104-112. Para minimizar el manejo y la contaminación del EAD, y facilitar el transporte, el medio de recolección de EAD se pueden remover del entorno de IVR 200 y colocarse directamente en un recipiente estéril (por ejemplo, un tubo sellable reversiblemente).

En ciertas modalidades del método, recibir una muestra de prueba que incluye EAD capturado puede incluir recibir el propio EAD capturado. En otras modalidades, recibir una muestra de prueba que incluye EAD capturado puede incluir recibir el EAD capturado en tanto que aún se retiene en el medio de recolección de EAD. En modalidades adicionales, recibir una muestra de prueba que incluye EAD capturado puede incluir recolectar el EAD del flujo de aire, como se analiza en la presente.

Con referencia continua a la figura 1, como se divulga en la presente, el método 100 puede incluir una operación de preprocesamiento 114 para la preparación de una muestra sin EAD que se va a analizar con muestras de EAD recolectadas. Los ejemplos de estas muestras no de EAD pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más gránulos fecales, material biológico recolectado de hisopos orales, material biológico recolectado de hisopos corporales, y tejido.

Por ejemplo, se supone que la muestra no de EAD son gránulos fecales. La operación de preprocesamiento 114 procesa los gránulos fecales en una suspensión espesa para usarse después en el aislamiento de ácidos nucleicos para la prueba. Los gránulos fecales se pueden recolectar de jaulas de estante. Como se divulga en la presente, los gránulos fecales se pueden obtener de diferentes líneas de roedores y roedores adultos en intervalos de edad óptimos diana (por ejemplo, 6-10 semanas). Una vez obtenidos, uno o más de los gránulos fecales se transfieren a un tubo de microcentrífuga con uno o más rodamientos de bolas de acero inoxidable. Se adiciona una cantidad seleccionada de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) al tubo que contiene los gránulos para formar una muestra de gránulo fecal. La muestra de gránulo

fecal se rompe en un molino mezclador durante un tiempo seleccionado a una frecuencia seleccionada y posteriormente se centrifuga. Posteriormente, la muestra fecal se puede agrupar con EAD recolectado para la coextracción de ácido nucleico.

- 5 Debido a que los gránulos fecales contienen ácidos biliares, productos de degradación de hemoglobina, polisacáridos complejos, y otros compuestos que pueden inhibir la amplificación, la operación de preprocesamiento 114 se realiza para concentrar agentes de interés (por ejemplo, virus, bacterias y otros patógenos asociados a material micro/macrobiológico) para el aislamiento de ácido nucleico, pero también excluyendo tanto como sea posible el contenido fecal.
- 10 Debido a que la operación de preprocesamiento 114 concentra agentes de interés, realizar la operación de preprocesamiento 114 como parte del método 100 puede ser beneficioso para mejorar la detección de organismos con bajo número de copias. Los ejemplos de organismos con bajo número de copias pueden incluir, de modo no taxativo, *Staphylococcus spp.* (bacterias), *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* (bacterias), *Giardia spp.* (protozoos), *Cryptosporidium spp.* (protozoos), *Entamoeba spp.* (protozoos), *Spironucleus spp.* (protozoos), norovirus murino (virus),
- 15 *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp.* beta-hemolítico

En la operación 104, la muestra de prueba que incluye EAD recolectada (y, como se describe en la presente, opcionalmente agrupada con material no de EAD preprocesado en la operación 114) se procesa adicionalmente para aislar ácidos nucleicos de la misma (por ejemplo, ARN, ADN, y combinaciones de los mismos). En ciertas modalidades,

20 el aislamiento de ácido nucleico se lleva a cabo por aislamiento magnético. El aislamiento magnético, aunque limitado en el rendimiento total, proporciona un ácido nucleico altamente purificado. En la experiencia del inventor, el aislamiento magnético incluye una mejor recuperación de ARN versus otros métodos de columna, así como una reducción observada de inhibidores de PCR. Sin embargo, se puede entender que se pueden emplear procesos alternativos para el aislamiento de ácidos nucleicos, solos o en combinación con aislamiento magnético, sin límite. Los ejemplos de estos procesos de

25 aislamiento alternativos incluyen, uno o más de aislamiento de ácido nucleico basado en columna, métodos de extracción orgánica, y lisis alcalina.

En modalidades adicionales, se puede adicionar opcionalmente un control de recuperación de ácido nucleico (NARC) a los ácidos nucleicos aislados en la operación 104. El NARC es un ARN de algas único (o ADN cuando sólo se realizan pruebas de ADN). Al adicionar el NARC al agente amortiguador de lisis, permite el monitoreo de cualquier tipo de muestra y proporciona verificación de que cualquier ácido nucleico presente en el paso de lisis se recuperó exitosamente. Algunas muestras pueden contener poco o ningún ácido nucleico y otras pueden tener una gran variación, por lo que la medición de la densidad óptica para determinar el contenido de ácido nucleico no es útil. Por consiguiente, la extracción exitosa (recuperación de ácido nucleico) así como una reacción de transcripción inversa exitosa se verifican cada una por la

30 realización de un ensayo separado para la plantilla de NARC como parte de los controles ejecutados durante el análisis de prueba de amplificación.

En la operación 106, cuando el ARN está presente, solo o en combinación con ADN, el ARN se transcribe de manera inversa en ADNc, que se requiere para los virus de ARN. Alternativamente, si sólo está presente ADN en el ácido nucleico aislado, se puede omitir esta operación de transcripción inversa.

40

Después de la transcripción inversa, la amplificación se realiza en la operación 110. En una modalidad, la amplificación se puede realizar por amplificación isotérmica mediada por bucle o reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los ejemplos de PCR incluyen, pero no se limitan a, PCR de punto final (por ejemplo, electroforesis en agarosa, arreglos de hibridación, etc.) y PCR en tiempo real (por ejemplo, PCR de baliza molecular, PCR de TaqMan, PCR de SYBR Green, etc.).

45

En una modalidad, la amplificación se realiza por PCR de TaqMan. Las muestras que se evalúan para pequeños paneles de agentes se evalúan en una plataforma de PCR de TaqMan en tiempo real de 96 pocillos o 384 pocillos. Las muestras que se evalúan para grandes paneles de agentes se preamplifican primero y entonces se amplifican por PCR de TaqMan en tiempo real en un arreglo abierto. También se adiciona un control de espícula de ADN para monitorear la inhibición de la PCR en el paso de preamplificación para los paneles evaluados en el arreglo abierto. Para los formatos de 96 y 384 pocillos, el pico se adiciona como un ensayo separado durante la prueba de PCR para todas las muestras.

50

Posteriormente se realiza un ensayo de PCR para la detección de agentes infecciosos seleccionados. Se preparan aproximadamente 100 plantillas de copia por la clonación de secuencias diana en vectores de plásmidos y se utilizan como plantillas de control positivo. También se incluyen aproximadamente 1000 copias de plásmidos para pruebas de arreglo abierto. Los pocillos de plantilla negativa se utilizan para todos los formatos. Las muestras simuladas de control de NARC y espícula procesadas junto con las muestras de campo se evalúan para demostrar la función de estas plantillas y ensayos de control.

55

En la operación 112, se realiza un análisis del ensayo. Después de la amplificación por PCR, los valores de Ct (ciclo umbral) se miden para las muestras y las muestras se evalúan con base en los valores de Ct medidos. Los valores de Ct son una medida relativa de la concentración de diana en la reacción de PCR. Se puede encontrar información adicional con respecto al análisis de muestras en "Efficacy of Direct Detection of Pathogens in Naturally Infected Mice by Using a High-Density PCR Array," J. Am Assoc. Lab Anim. Sci. Vol. 52, No. 6, págs. 763-772 (2013).

60

65

EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, se simuló una infección de baja prevalencia en un IVR. Las muestras de EAD se recolectaron por el uso de dispositivos de recolección en línea con el flujo de aire. Las muestras comparativas se recolectaron de centinelas y hisopos de lecho sucio. Todas las muestras recolectadas se analizaron por separado usando PCR de acuerdo con modalidades del método 100 de la figura 1 analizado anteriormente. Las muestras obtenidas de centinelas de lecho sucio se analizaron adicionalmente por examinación tradicional (por ejemplo, serología, cultivo bacteriano, parasitología).

Metodología

Diseño de estudio

Fuente de agente infeccioso: Los ratones de la tienda de mascotas se colocaron en 4 jaulas en cada lado de estante. Se alojaron dos ratones en cada jaula, uno de 3-4 semanas de edad y el otro de 6-10 semanas de edad. Suponiendo 80 jaulas en total en el estante, estas condiciones simulaban una prevalencia de aproximadamente 5% en el estante (4/80 jaulas).

Animales de centinela: Se proporcionaron 4 jaulas de centinelas de lecho CD-1 Elite en el IVR. Se proporcionaron 3 ratones de centinela por jaula. Se envió 1 ratón por jaula por mes para PCR y pruebas tradicionales (total de 4 por mes).

Simulación de una baja prevalencia: El lecho sucio de "dilución verdadera" al 5% de los ratones de la tienda de mascotas se colocó con los ratones de centinela. El lecho sucio se diluyó con lecho sucio de ratones gnotobióticos para lograr la concentración deseada.

Todas las jaulas se colocaron en ubicaciones más alejadas de los sitios de hisopo de EAD incipientes.

Recolección de muestras de polvo de aire de escape

Con referencia a las figuras 3A-3B y 4A-4C, ahora se analizará la recolección de muestras de EAD por medios de recolección de EAD en línea e hisopo. La figura 3A presenta una ilustración esquemática de una modalidad de un entorno de jaula 300 que incluye una IVR 302 que aloja jaulas 308 en comunicación para fluidos con un sistema de ventilación cerrado 304 del cual se recolecta EAD en los presentes ejemplos. Se distribuye un suministro de aire estéril 312 a un pleno de suministro en general vertical 306 del IVR 302 desde el sistema de ventilación 304. El pleno de suministro vertical 306 dirige el aire de suministro estéril 312 a través de las jaulas 308 a través de una pluralidad de plenos horizontales en general alargados 314 desde el pleno de suministro vertical 306 a un segundo extremo opuesto del estante que incluye un pleno de escape en general vertical 316. El EAD y los patógenos unidos al mismo se portan por el flujo de aire de IVR 320 a través de las respectivas jaulas 308 fuera del IVR 302 como aire de escape 320. El sistema de ventilación 304 incluye un montaje de filtro pre-HEPA 310a y un montaje de filtro de HEPA 310b. El montaje de filtro pre-HEPA 310a recibe el aire de escape 320. El aire que fluye a través del conjunto de filtro pre-HEPA 310a se dirige al conjunto de filtro HEPA 310b, donde sale como aire de suministro 312.

Una pluralidad de medios de recolección de EAD 224 se colocan adicionalmente para capturar EAD sin interferir con el flujo de aire a través del IVR 302. Un primer medio de recolección de EAD 322a es un filtro físico suspendido cerca de una parte superior del pleno de escape vertical 316, al que se hace referencia en la presente como filtro de pleno de escape 322a.

Con referencia adicional a las figuras 4A-4D, el filtro de pleno de escape 322A se soporta dentro del pleno de escape vertical 316 por un retenedor de medios de recolección de EAD 400. El soporte 400 incluye un collar de anillo 402 unido a un bastidor 410. Como se analiza en mayor detalle más adelante, en uso, el collar de anillo 502 se puede ajustar de manera deslizante en un extremo 450 del pleno de escape vertical 316.

En una modalidad, el soporte 400 y el bastidor 402 se pueden formar de metal o plástico. En una modalidad, el bastidor 402 se forma de acero inoxidable y el collar de anillo 402 se suelda al bastidor 402. El bastidor 404 se puede formar de una pluralidad de miembros horizontales 406 que se extienden desde el miembro vertical 410 para formar un patrón de cuadrícula. El reborde vertical 412 se puede colocar en los bordes externos 414 del bastidor 404. El patrón de cuadrícula retiene el medio de recolección de EAD 224 y proporciona suficiente contacto del aire de escape 320 con el filtro de pleno de escape 322a.

El bastidor 404 se puede girar en las direcciones de las flechas 432 para colocar el bastidor 404 en un ángulo, A, con respecto al aire de escape 320 dentro del pleno de escape vertical 316. Esta colocación adapta el grado de contacto del aire de escape 320 con el filtro de pleno de escape 322a (por ejemplo, flujo de aire de escape 320 a lo largo de la longitud del filtro de pleno de escape 322a). Esta capacidad de ajuste es beneficiosa para minimizar el impacto del filtro de la cámara de pleno de escape 322a en el flujo de aire dentro del IVR 202. Un reborde horizontal 416 en un extremo 420 del bastidor 404 puede generar además turbulencia dentro del aire de escape 320 que fluye sobre el retenedor de medios de recolección 404 para facilitar la captura de EAD del aire de escape 320.

Una pinza de muelle 422 se puede unir a la montura central 424 de la sujeción de anillo 112 al insertar un extremo 426 de la pinza de muelle 422 a través de una ranura 430 en la montura central 424. La pinza de muelle 422 asegura el medio de recolección de EAD 322a al bastidor 404. Mover la pinza de muelle 422 lejos del plano del bastidor 404 permite la inserción o remoción del filtro de pleno de escape 322a del retenedor de medios de recolección de EAD 400.

Las figuras 5A-5C muestran una modalidad alternativa de un retenedor de medios de recolección de EAD 500 para el soporte del filtro de pleno de escape 322a. El collar de anillo 502 se puede unir a una pluralidad de bastidores, tal como 504a, 504b. El collar de anillo 502 y los bastidores 502a, 502b son como se analiza anteriormente con respecto al collar de anillo 402 y el bastidor 404, excepto como se describe a continuación. El collar de anillo 502 se puede ajustar de manera deslizante en el extremo 450 del pleno de escape vertical 316. En los métodos y el sistema, una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a la dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape. Cada uno de los retenedores de medios de recolección de EAD 504a, 504b se puede inclinar en un ángulo A con respecto al aire de escape 320 dentro del pleno de escape vertical 316. Esta colocación permite que se ajuste el grado de contacto del aire de escape 320 con el filtro de pleno de escape 322a (por ejemplo, flujo de aire de escape 320 a lo largo de la longitud del filtro de pleno de escape 322a). Esta capacidad de ajuste es beneficiosa para minimizar el impacto del filtro de la cámara de pleno de escape 322a en el flujo de aire dentro del IVR 202.

La pinza de muelle 522a puede unir el retenedor de medios de recolección de EAD 504 a la montura central 524a de la sujeción de anillo 502 al insertar el extremo 526a de la pinza de muelle 522a a través de la ranura 530a en la montura central 524a. La pinza de muelle 522b puede unir el retenedor de medios de recolección de EAD 504b a la montura central 524b del collar de anillo 502 al insertar el extremo 526b de la pinza de muelle 522b a través de la ranura 530b en la montura central 524b. Las pinzas de muelle 522a, 522b proporcionan sujeción del medio de recolección de EAD 224a como se muestra en la figura 5B. Mover la pinza de muelle 522a, 522b lejos del plano de su respectivo bastidor 504a, 504b permite la inserción o remoción del medio de recolección de EAD 224a del retenedor de medios de recolección de EAD 500.

Las figuras 6A-6B son ilustraciones esquemáticas de modalidades de medios de recolección de EAD 224 adecuados para usar uno o más del medio de recolección de EAD (por ejemplo, 224a, 224b, 322a, 322b, 322c). El medio de recolección de EAD 224 incluyen medios 602 acoplados a un bastidor de medios 604. El bastidor de medios 604 se extiende alrededor de un borde exterior 606 del medio 602. En una modalidad, el medio 602 se sella por calor al bastidor de medio 604 para proporcionar una estructura más rígida que facilita la manipulación, inserción, y extracción del medio 602 (por ejemplo, del retenedor de medios de EAD 400, 500). El bastidor de medios 604 se puede marcar opcionalmente con indicios 610 (por ejemplo, un punto o muesca) para usarse en la identificación de una dirección de inserción del medio de recolección de EAD 224 en el retenedor de medios de recolección de EAD 400, 500. El bastidor de medios 604 puede incluir además uno o el armazón de medios 604 puede incluir además uno o más chaflanes 612 colocados en un ángulo α con respecto a sus bordes longitudinales.

En una modalidad, el medio 602 se puede construir de una estructura de gradiente electrostática y controlada que incluye fibras de polipropileno/polietileno tejidas térmicamente, unión por hilatura, filamento continuo y atrae partículas cargadas tanto de manera positiva como negativamente con baja recuperación de humedad. El medio 602 puede impedir que las fibras se hinchen debido a la humedad absorbida de la corriente de aire. En una modalidad, el medio 602 es blanco. El medio 602 puede llevar una clasificación MERV (Valor de Clasificación de Eficiencia Mínima) variable entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 (por ejemplo, 8). En modalidades adicionales, el medio 602 puede poseer un peso base de 67.8115 gr/m² (2.00 oz/yd²), espesor de 1.6256 mm (64 milésimas de pulgada), y permeabilidad al aire de Frazier de 13.72 m³/min/m² (490 cfm/ft²). En otras modalidades, las fibras de polipropileno del medio 602 se pueden sustituir por fibras de poliolefina.

En una modalidad, el bastidor 602 se puede fabricar de varias fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de poliéster). En una modalidad, el bastidor 602 también funciona como un medio de recolección. Por ejemplo, el bastidor 602 puede incluir un medio de recolección hilado blanco con un peso base de 271.246 gr/m² (8.0 oz/yd²), espesor nominal de 0.5842 mm (23 milésimas de pulgada) de tira de tracción MD de 1 133.98093 kg (125 pies lb/0.6 pulg). En modalidades adicionales, el bastidor 602 se puede construir de cualquiera del medio de recolección que se pueden sellar térmicamente a los medios de EAD 604 y tiene un peso base entre 6 y 10.

La figura 6B muestra una modalidad alternativa del medio de recolección de EAD 224 que incluye una perforación 650. La perforación 650 se coloca entre un primer lado 652 y un segundo lado 654 del medio de recolección de EAD 224. La perforación 650 se puede separar para separar el primer y segundo lados 652, 654 del medio de recolección de EAD 224 entre sí.

En una modalidad no limitante, las dimensiones del medio de recolección de EAD 224 son las siguientes. Una longitud total, L₁, de la colección de EAD 224 es de 9.525 cm (3.75 pulg). Una longitud, L₂, desde un primer extremo del bastidor de medios 604 hasta el chaflán 612 es de 8.255 cm (3.25 pulg). Un borde de bastidor, B, es de 9.525 cm (0.375 pulg). Un ancho de medio de Colección de EAD, W, es de 2.312 pulg. Un espesor de medio de recolección de EAD, T, es menor que o igual a 0.08128 cm (0.032 pulg). Se puede entender que las dimensiones anteriores se proporcionan con el propósito de ejemplo y que el medio de recolección de EAD 224 pueden poseer otras dimensiones, según sea necesario.

Durante la recolección de EAD, el collar anular 402 o 502 se monta adyacente a un extremo superior del pleno de escape vertical 316 (figura 4D). Colocado de esta manera, el filtro de pleno de escape 322a se suspendi dentro del pleno de escape vertical 316 con el ángulo A establecido como un ángulo agudo entre el plano del filtro de el pleno de escape 322a y una dirección de flujo del aire de escape 320. El ángulo agudo se selecciona dentro del intervalo de 15° a 25° (por ejemplo, 20°) con respecto a la dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape vertical 316. En modalidades adicionales, las dimensiones en el plano del filtro de pleno de escape 322a también pueden ser más pequeñas que las dimensiones de sección transversal de el pleno de escape vertical 316. De esta manera, el EAD se puede capturar del aire de escape 320 sin interferir sustancialmente con el flujo de aire de escape 320.

Como se ilustra adicionalmente en las figuras 3A y 4C, el EAD también se recolectó usando un segundo medio de recolección de EAD 322b (un filtro físico) unido a una cara delantera (frente aguas arriba) de un filtro pre-HEPA 450 del montaje de filtro pre-HEPA 310a. Cada uno del medio de recolección de EAD 322a, 322b se desplegó durante 3 meses. A medida que cada uno del medio de recolección de EAD 322a, 322b captura EAD del aire de escape 320 (es decir, aire que ha pasado a través de la extensión del IVR 302), se espera que cualquier EAD recolectado sea representativo del IVR 302 en su conjunto.

Como se ilustra adicionalmente en la figura 3B, el EAD se recolectó adicionalmente del flujo de aire 350 dentro y/o jaulas adyacentes 308 que contienen lecho sucio (no mostrado). Cada jaula 308 incluyó una parte inferior 352, una parte superior 354, paredes laterales 356, una tapa porosa 360 y un tercer medio de recolección de EAD 322c. El tercer medio de recolección de EAD 322a (un filtro físico) se colocó en la parte superior de la jaula 356, que está en comunicación para fluidos a través de la tapa de la jaula 356 con el flujo de aire 350a que circula a través de un volumen interior de la jaula 308, así como el flujo de aire 350b que pasa sobre la tapa de jaula 350. Sin embargo, se puede entender que, en modalidades alternativas, se pueden colocar medios de recolección de EAD adicionales en cualquier pared lateral de jaula, dentro de cualquier jaula, o adyacentes a cualquier jaula, según sea apropiado. Se colocó un nuevo medio de recolección de EAD 322c (5.08 cm o 6.35 cm x 7.62 cm (2" o 2.5" x 3")) en cada parte superior de jaula 360 al inicio del estudio y cada 3 meses a partir de entonces. La parte superior de jaula 360 se transfirió adicionalmente cada vez que se limpió la jaula 308.

Se obtuvieron muestras de prueba adicionales de hisopos del IVR 302 para comparación con muestras de prueba recolectadas por el medio de recolección de EAD 322a, 322b, 322c. Se recolectaron hisopos de polvo en cada pleno horizontal 314 y se agruparon (figura 7A), con evaluación cada 3 meses. También se recolectaron dos hisopos de polvo de una manguera de escape 700 que conecta el pleno de escape vertical 316 al conjunto de filtro pre-HEPA 310a (figura 7B), con evaluación cada 3 meses.

Análisis de Muestra

Aislamiento de ácido nucleico: El aislamiento de ácidos nucleicos se realiza por aislamiento magnético. Para los EAD capturados por el medio de recolección de EAD, el medio de recolección de EAD se colocan en un tubo (por ejemplo, el mismo tubo en el que se transportan el medio de recolección de EAD), curvado con el EAD que da hacia adentro. Para el polvo recogido por hisopos comparativos, los hisopos se transfieren a un tubo limpio lo suficientemente grande como para acomodar el número de hisopos que se van a analizar. Se pipetea una solución de lisis directamente sobre los medios o hisopos de recolección de EAD.

Los respectivos tubos se someten posteriormente a un vórtice para lavar a fondo el medio de recolección de EAD o los hisopos con la solución de lisis. Los respectivos tubos se centrifugan adicionalmente para hacer girar la solución de lisis hacia abajo desde la parte superior del primer tubo. Se adiciona además un control de recuperación de ácido nucleico (NARC) a los respectivos tubos. El NARC permite el monitoreo de cualquier tipo de muestra y proporciona verificación de la recuperación de ácidos nucleicos presentes en la lisis. Extracción exitosa (recuperación de ácido nucleico) así como una reacción de transcripción inversa exitosa (el ARN se transcribe a ADNc para detectar virus de ARN por PCR) por la realización de un ensayo separado para la plantilla de NARC como parte de los controles ejecutados durante el análisis de prueba de PCR.

Se adiciona una cantidad seleccionada de isopropanol a todos los pocillos de muestra, mezclando en tanto que se adiciona, seguido por incubación a temperatura ambiente durante al menos 1 minuto. Se adiciona una suspensión uniforme de cuentas de mezcla a cada pocillo que contiene una lisis de muestra e isopropanol.

Posteriormente, las muestras de lisis y los reactivos apropiados se colocan en un procesador de partículas magnéticas Kingfisher^{MR} 96 (Thermo Scientific^{MR}, Waltham, MA, EUA). El Kingfisher^{MR} utiliza varillas magnéticas permanentes y peines de punta desechables para mover las partículas a través del proceso de purificación.

Transcripción inversa: La transcripción inversa de ARN en ADNc se realiza adicionalmente si los ácidos nucleicos aislados contienen ARN, puesto que se requiere ADNc para los virus de ARN (la PCR requiere ADN como plantilla). La transcripción inversa se realiza utilizando un kit comercial. Los reactivos del kit se preparan en pocillos de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra que se va a analizar que contiene ARN, se adiciona un volumen apropiado de la muestra al pocillo de reacción correspondiente. Los pocillos se cubren y centrifugan para asegurar la mezcla de todos los componentes.

Amplificación por PCR: Las muestras evaluadas para pequeños paneles de agentes infecciosos están en una plataforma de PCR de TaqMan en tiempo real de 96 pocillos o 384 pocillos. Las muestras que se evalúan para grandes paneles de agentes infecciosos se preamplifican primero antes de la amplificación por PCR de TaqMan en tiempo real en un arreglo abierto.

La preamplificación emplea una concentración de cebadores (los mismos cebadores utilizados para los ensayos de TaqMan analizados a continuación). Se observa que, a la concentración de cebador completa, la preamplificación permitirá un incremento en el número de copias de aproximadamente 3 Log10. En general, la concentración de cebador se limita a evitar que cualquier plantilla domine la reacción y evite la detección de plantillas presentes en un número de copia más pequeño (el cebador para agentes de plantilla grandes se utiliza en los primeros ciclos de pareja). La concentración del cebador está limitada además en la preamplificación para agentes infecciosos que se conoce que siempre están presentes en grandes números de copias.

Control de espícula: se adiciona un control de espícula de ADN para monitorear la inhibición de la PCR en la preamplificación para los paneles evaluados en el arreglo abierto. Para los formatos de 96 y 384 pocillos, el pico se adiciona como un ensayo separado durante la prueba de PCR para todas las muestras.

Ensayos de PCR: los ensayos de PCR se han diseñado para incorporar secuencias de dominios públicos y secuencias únicas que no están disponibles en el dominio público.

Se prepararon 100 plantillas de copia clonando secuencias diana en vectores de plásmidos y se utilizaron como plantillas de control positivo. También se incluyen 1000 copias de plásmidos para pruebas de arreglo abierto. Los pocillos de plantilla negativa se utilizan para todos los formatos. Las muestras simuladas de control de NARC y espícula procesadas junto con las muestras de campo se evalúan para demostrar la función de estas plantillas y ensayos de control.

Interpretación de ensayo: Los valores de Ct obtenidos para las muestras se evalúan con base en el valor de Ct, pero también en la experiencia general y la observación para descartar la contaminación cruzada. Los valores válidos de TC para la determinación de muestras positivas son con base en la experiencia y el conocimiento general de los agentes individuales.

Resultados de prueba

Virus

La tabla 1 compara los resultados de las pruebas para muestras obtenidas de cuatro fuentes diferentes: animales de centinela, filtros de jaula de EAD, hisopos de EAD, y filtros en línea de EAD. Para los animales de centinela, el análisis se realiza por serología, cultivo bacteriano, y parasitología ("Tradicional") y PCR. Para hisopos de EAD, las muestras adquiridas de hisopos de manguera y cámara, como se analiza anteriormente, se analizan por PCR. Para los filtros de jaula de EAD, se adquieren muestras de prueba sin que esté presente un animal de centinela dentro de la jaula ("sin centinela") y con un animal de centinela presente dentro de la jaula ("con centinela") y se analizan por PCR. Para los filtros en línea de EAD, las muestras de prueba adquiridas del medio de recolección de EAD colocados dentro del pleno de escape vertical de IVR y adyacentes al filtro pre-HEPA se analizan por PCR.

TABLA 1 - RESULTADOS DE PRUEBA de VIRU

Agente	Centinela		Filtro de jaula de EAD		Hisopo de EAD		Filtro en línea de EAD	
	Tradicional	PCR	sin Centinela	con Centinela	Hisopo de manguera	Hisopo de pleno	Filtro de escape	Filtro pre-HEPA
Adenovirus	0	0	0	1	0	0	1	1
Coronavirus	1	0	0	4	1	1	1	1
Parvovirus de ratón	4	1	0	4	1	1	1	1
Theilovirus	0	0	1	2	1	1	1	1
% Positivo total	31.3%	6.3%	6.3%	68.8%	75.0%	75.0%	100%	100%

A partir de los resultados de la tabla 1, se puede observar que el análisis de muestras recolectadas de animales de centinela produce el indicador más pobre de virus, detectando sólo 31% de los virus por examinación tradicional y aproximadamente 6.3% por PCR. El análisis de las muestras recolectadas del medio de recolección de EAD a nivel de jaula exhibe un éxito mixto, identificando sólo el 6.3% de los virus cuando el centinela no estaba presente dentro de la jaula, pero aproximadamente el 68.8% de los virus cuando el centinela estaba presente. El análisis de las muestras recolectadas de hisopos de EAD en la manguera y el pleno exhibe una buena exactitud, cada una de las cuales detecta

el 75% de los virus. El análisis de las muestras recolectadas en línea con el aire de escape dentro del pleno de escape vertical y adyacente al filtro pre-HEPA exhibe la mayor exactitud, cada una detectando el 100% de los virus presentes.

La copia estimada de los virus anteriores, determinada por PCR de TaqMan en tiempo real de muestras de prueba recolectadas de hisopos y medios de recolección de EAD, se ilustra en la figura 8A. Como se indica anteriormente, el valor de Ct es una medida relativa de la concentración de una diana. Conforme la concentración elevada incrementa la probabilidad de detección, se prefieren valores más altos de Ct. Se puede observar en la figura 8A que para cada virus, las muestras de EAD recolectadas por el medio de recolección de EAD demuestran valores de Ct comparables o mayores que las muestras con hisopos.

Bacterias

El análisis de la muestra para las bacterias seleccionadas se ilustra en la tabla 2 a continuación.

TABLA 2 - RESULTADOS DE PRUEBAS DE BACTERIAS

Agente	Centinela		Filtro de jaula de EAD		Hisopo de EAD		Filtro en línea de EAD	
	Tradicional	PCR	sin Centinela	con Centinela	Hisopo de manguera	Hisopo de pleno	Filtro de escape	Filtro pre-HEPA
Estreptococo beta de grupo B	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>H.ganmani</i>	N/A	0	0	2	0	0	1	
<i>H.hepaticus</i>	N/A	0	0	0	0	0	0	
<i>H.typhlonius</i>	N/A	0	0	3	1	1	1	
<i>Helicobacter</i>	N/A	0	2	4	1	1	1	
<i>M. pulmonis</i>	0	3	0	2	1	1	1	1
<i>P.mirabilis</i>	0	0	2	3	1	0	0	0
<i>P.multocida</i>	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>P.pneumotropica</i>	0	3	1	4	1	1	1	
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
% Positivo total	0%	15.0%	12.5%	47.5%	50.0%	40%	80%	40%

A partir de la tabla 2, se puede observar que el análisis de muestras recolectadas de animales de centinela produce el indicador más pobre de bacterias, no detectando ninguna bacteria por examinación tradicional y 15% por PCR. El análisis de las muestras recolectadas por el medio de recolección de EAD a nivel de jaula exhibe un éxito mixto, identificando sólo el 12.5% de las bacterias cuando el centinela no está presente dentro de la jaula, pero aproximadamente el 47.5% de las bacterias cuando el centinela está presente. El análisis de las muestras recolectadas de hisopos de EAD en la manguera y la cámara detecta el 50% y el 40% de las bacterias presentes. El análisis de las muestras recolectadas por el medio de recolección de EAD en línea con el aire de escape dentro del pleno de escape vertical exhibe la mejor precisión, detectando el 80% de las bacterias presentes. El análisis de las muestras recolectadas en línea con el flujo de aire de escape y adyacentes al filtro pre-HEPA detectan el 40% de las bacterias presentes.

La copia estimada de las bacterias anteriores se determina mediante PCR de TaqMan en tiempo real de muestras de prueba recolectadas de hisopos y medios de recolección de EAD se ilustra en la figura 8B. Como se indica anteriormente, el valor de Ct es una medida relativa de la concentración de una diana. Conforme la concentración elevada incrementa la probabilidad de detección, se prefieren valores más altos de Ct. Se puede observar en la figura 8B que para cada bacteria, las muestras de EAD recolectadas por el medio de recolección de EAD demuestran valores de Ct aproximadamente comparables o mayores que las muestras con muestras.

Protozoos

El análisis de cada muestra para protozoos seleccionados se ilustra en la tabla 3 a continuación.

TABLA 3 - RESULTADOS DE PRUEBAS DE PROTOZOOS

Agente	Centinela		Filtro de jaula de EAD		Hisopo de EAD		Filtro en línea de EAD	
	Tradicional	PCR	sin Centinela	con Centinela	Hisopo de manguera	Hisopo de pleno	Filtro de escape	Filtro pre-HEPA
Criptosporidio	0	0	0	2	1	1	1	1
Entamoeba	2	2	0	4	1	1	1	1
Giardia	0	0	0	1	0	0	1	1
Spironucleus muris	0	0	0	2	1	0	1	1
Tritichomonas	0	0	4	4	1	1	1	1
% Positivo total	31.3%	10%	20%	65%	80%	60%	100%	100%

5 A partir de la tabla 3, se puede observar que el análisis de muestras recolectadas de animales de centinela produce una indicación relativamente deficiente de protozoos, detectando sólo el 31.3% de los protozoos por examinación tradicional y aproximadamente 10% por PCR. El análisis de las muestras recolectadas del medio de recolección de EAD a nivel de jaula exhibe un éxito mixto, identificando sólo el 20% de los protozoos cuando el centinela no estaba presente dentro de la jaula, pero aproximadamente el 65% de los protozoos cuando el centinela estaba presente. El análisis de las muestras recolectadas de hisopos de EAD en la manguera y el pleno muestra una buena exactitud, detectando el 80% de los protozoos por hisopo de manguera y el 60% de protozoos por hisopo de pleno. El análisis de las muestras recolectadas por el medio de recolección de EAD en línea con el flujo de aire de escape exhibe la mejor exactitud, detectando cada uno el 100% de los protozoos presentes.

10 La copia estimada de los protozoos anteriores determinada por PCR de TaqMan en tiempo real de las muestras de EAD recolectadas se ilustra en la figura 8C. Como se indica anteriormente, el valor de Ct es una medida relativa de la concentración de una diana. Conforme la concentración elevada incrementa la probabilidad de detección, se prefieren valores más altos de Ct. Se puede observar en la figura 8C que para cada protozoo, las muestras de EAD recolectadas por el medio de recolección de EAD demostraron valores de Ct comparables o mayores que las muestras con hisopos.

Parásitos metazoos

20 El análisis de cada muestra para los parásitos seleccionados se ilustra en la tabla 4 a continuación.

TABLA 4 - RESULTADOS DE PRUEBA DE PARÁSITOS

Agente	Centinela		Filtro de jaula centinela		Hisopo de EAD		EAD en línea	
	Tradicional	PCR	sin Centinela	con Centinela	Hisopo de manguera	Hisopo de pleno	Filtro de escape	Filtro pre-HEPA
<i>Demodex</i>	0	0	0	1	0	1	1	1
<i>Myobia/Radfordia</i>	0	1	0	2	1	1	1	0
<i>Myocoptes</i>	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Lombrices intestinales</i>	0	0	0	4	0	1	1	1
% Positivo total	0%	6.3%	0%	43.8%	50%	100%	100%	50%

25 Se puede observar a partir de la tabla 4 que el análisis de muestras recolectadas de animales de centinela produce una indicación relativamente pobre de parásitos, no detectando ninguno de los parásitos por examinación tradicional y aproximadamente 6.3% por PCR. El análisis de las muestras recolectadas del medio de recolección de EAD a nivel de jaula exhibe un éxito mixto, no identificando ninguno de los parásitos cuando el centinela no está presente dentro de la jaula, sino aproximadamente 43.8% de los parásitos cuando el centinela está presente. El análisis de las muestras recolectadas por el medio de recolección de EAD en línea con el flujo de aire de escape dentro del pleno de escape exhibe una excelente exactitud, detectando el 100% de los parásitos presentes. El análisis de las muestras recolectadas por el medio de recolección de EAD en línea con el flujo de aire de escape adyacente al filtro pre-HEPA detectó 50% de los parásitos presentes.

35 La copia estimada de los parásitos anteriores determinada por PCR de TaqMan en tiempo real de las muestras de EAD recolectadas se ilustra en la figura 8D. Como se indica anteriormente, el valor de Ct es una medida relativa de la concentración de una diana. Conforme la concentración elevada incrementa la probabilidad de detección, se prefieren

valores más altos de Ct. Se puede observar en la figura 8D que para cada parásito, las muestras de EAD recolectadas por el medio de recolección de EAD demostraron valores de Ct comparables o mayores que las muestras con hisopos.

Estos resultados de las pruebas indican que el análisis por PCR de las muestras de EAD recolectadas por el medio de recolección de EAD en línea con el flujo de aire de escape de acuerdo con las modalidades de la presente divulgación detecta patógenos a un nivel comparable o mayor que los centinelas tradicionales o hisopos de EAD. La concentración de patógenos muestreados también es comparable o mayor que la de los centinelas tradicionales o hisopos de EAD.

Significativamente, el EAD recolectado por el medio de recolección de EAD a nivel de jaula fue un indicador relativamente deficiente de patógenos cuando un animal de centinela no está presente en la jaula. Sin embargo, la exactitud de estas muestras incrementó significativamente cuando un animal de centinela está presente dentro de la jaula. Se cree que esta diferencia es el resultado de la agitación del polvo proporcionada por el animal en movimiento.

Para explorar los beneficios anticipados de la agitación de polvo, sin requerir el uso de un animal centinela, se evalúa adicionalmente un sistema de recolección de EAD 900, ilustrado en la figura 9. El sistema 900 incluye un recinto reversiblemente sellable 902 que incluye una cámara 904 adaptada para recibir una jaula para animales 906, una toma de aire 910 acoplable con un suministro de aire 912, y un retorno de aire 914 acoplable con una fuente de vacío 916. El sistema 700 incluye además un dispositivo de accionamiento 720 y una pluralidad de medios de recolección de EAD 922 (por ejemplo, 922a, 922b, 922c).

El dispositivo de accionamiento 920 está en comunicación mecánica con el recinto 902 y se puede operar para agitar los contenidos de una jaula 906 colocada dentro de la cámara 904. El dispositivo de accionamiento 920 se puede configurar para mover el recinto 904 de manera horizontal, verticalmente y/o de manera giratoria, solo o en cualquier combinación, con el fin de liberar partículas de polvo del lecho 924 colocada dentro de la jaula 906. En modalidades adicionales, el dispositivo de accionamiento 920 puede ser un dispositivo ultrasónico.

El medio de recolección de EAD 922 son adecuados para capturar EAD transportados por un flujo de aire estéril 926 dirigido a través del recinto 902. El medio de recolección de EAD 922 puede ser el medio de recolección de EAD 224, como se analiza anteriormente. Como se describe en la presente, uno o más medios de recolección de EAD 922a se colocan dentro de la jaula 906 (por ejemplo, en una pared de la jaula 906 o suspendidos en esta). En el sistema, el medio de recolección de EAD se coloca dentro de un pleno de escape en comunicación para fluidos con e intermedia entre la cámara y la fuente de vacío. En otra modalidad, uno o más medios de recolección de EAD 922b se colocan fuera de la jaula 906 y dentro del recinto 902 (por ejemplo, en una pared del recinto 902 o suspendidos dentro de la cámara 904). En modalidades adicionales, uno o más medios de recolección de EAD 922c se colocan fuera del recinto 902 (por ejemplo, dentro de una ruta de flujo de aire en comunicación para fluidos con la fuente de vacío 916).

El EAD recolectado usando el sistema 900 se puede analizar adicionalmente para la detección de patógenos de acuerdo con el método 100, donde la operación de recolección 102 se realiza como se analiza anteriormente con respecto al sistema 900. Las operaciones 104-114 del método 100 de otra manera permanecen sin cambios.

Los términos y expresiones que se han empleado en la presente se usan como término de descripción y no de limitación, y no existe intención en el uso de estos términos y expresiones para excluir cualquiera de los equivalentes de las características mostradas o descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha divulgado específicamente por modalidades preferidas, las modalidades ejemplares y las características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos divulgados en la presente, y que estas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención como se define por las reivindicaciones anexas. Las modalidades específicas proporcionadas en la presente son ejemplos de modalidades útiles de la presente invención y será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede llevar a cabo utilizando una gran cantidad de variaciones de los dispositivos, componentes de dispositivo, pasos de métodos establecidos en la presente descripción. Como será obvio para un experto en la técnica, los métodos y dispositivos útiles para los presentes métodos pueden incluir una gran cantidad de elementos y pasos de composición y procesamiento opcionales.

Se debe observar que como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencia plural salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una celda" incluye una pluralidad de estas celdas y equivalentes de las mismas conocidas por aquellos expertos en la técnica, y así sucesivamente. También, los términos "uno" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar indistintamente en la presente. También se debe observar que los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pueden usar indistintamente. La expresión "de cualquiera de las reivindicaciones XX-YY" (en donde XX e YY se refieren a números de reivindicación) se propone que proporcione una reivindicación dependiente múltiple en la forma alternativa, y en algunas modalidades es intercambiable con la expresión "como en cualquiera de las reivindicaciones XX-YY".

A menos de que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que normalmente se entendería por un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Aunque cualquier método o material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente se puede utilizar en la

práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Nada de la presente se debe interpretar como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder esta divulgación en virtud de la invención anterior.

5 Cada formulación o combinación de componentes descritos o ejemplificados en la presente se puede utilizar para practicar la invención, salvo que se indique lo contrario.

10 Siempre que se proporcione un intervalo en la especificación, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición o concentración, se pretende que todos los intervalos y subintervalos intermedios, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos proporcionados se incluyan en la divulgación. Como se utiliza en la presente, los intervalos incluyen específicamente los valores proporcionados como valores de punto final del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de 1 a 100 incluye específicamente los valores de punto final de 1 y 100. Se entenderá que cualquier subintervalo o valor individual en un intervalo o subintervalo que se incluya en la descripción en la presente se puede excluir de las reivindicaciones en la presente.

15 Como se utiliza en la presente, "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", y es inclusivo o abierto y no excluye, elementos adicionales no citados o pasos del método. Como se utiliza en la presente, "que consta de" excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no especificado en el elemento de reivindicación. Como se utiliza en la presente, "que consta esencialmente de" no excluye materiales o pasos que no afectan sustancialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso en la presente cualquiera de los términos "que comprende", "que consta esencialmente de", y "que consta de" se pueden reemplazar con cualquiera de los otros dos términos.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar patógenos, que comprende:
5 recibir una muestra de prueba que comprende polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire dentro de un pleno de escape de un estante de jaula ventilado individualmente (IVR) por medio de recolección de filtración de aire, en donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape durante la captura de la muestra de prueba.
aislar una pluralidad de ácidos nucleicos de la muestra de prueba, en donde la pluralidad de ácidos nucleicos es representativa de uno o más patógenos;
10 amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos; y
analizar los ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de un patógeno unido a la muestra de prueba.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende al menos uno de amplificación isotérmica mediada por bucle y reacción en cadena de polimerasa (PCR).
3. El método de la reivindicación 2, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende PCR seleccionada del grupo que consta de PCR de punto final y PCR en tiempo real.
4. El método de la reivindicación 3, en donde:
20 aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende extraer una muestra de ARN de la muestra de prueba y transcribir de forma inversa la muestra de ARN extraída en una muestra de ADNc;
amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende amplificar la muestra de ADNc por PCR en tiempo real; y
25 analizar los ácidos nucleicos amplificados comprende medir un valor de Ct de la muestra de ADNc amplificada.
5. El método de la reivindicación 3, en donde:
aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende extraer una muestra de ADN de la muestra de prueba;
30 amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende amplificar la muestra de ADN por PCR en tiempo real; y
analizar los ácidos nucleicos amplificados comprende medir un valor de Ct de la muestra de ADN amplificada.
6. El método de la reivindicación 3, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende PCR y en donde el análisis de los ácidos nucleicos amplificados comprende análisis de tiempo de vuelo de productos de PCR.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la muestra de prueba comprende polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire durante un período de tiempo de al menos 2 semanas.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el IVR comprende además al menos una jaula que aloja un animal de prueba.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el uno o más patógenos se seleccionan del grupo que consta de:
45 *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Spironucleus spp.*, *Norovirus murino*, *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp. beta-hemolítico*
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende al menos uno de aislamiento magnético, aislamiento de ácido nucleico basado en columna, métodos de extracción orgánica, y lisis alcalina.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el IVR no comprende una jaula que aloja un animal de centinela.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el medio de recolección comprende un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el medio de recolección posee una eficiencia seleccionada dentro del intervalo de 5 % a 40 %.
14. El método de la reivindicación 12, en donde el medio de recolección es un filtro graduado.
15. Un método para detectar patógenos unidos al polvo de aire ambiental, que comprende:
65 recibir una muestra de prueba que comprende polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire que pasa a través de un recinto por medio de recolección de filtración de aire dentro de un pleno de escape en comunicación con el recinto, el recinto que comprende una cámara que contiene una jaula para animales en comunicación para fluidos con el flujo de

- aire y el polvo de aire ambiental liberado por agitación de lecho sucio de un animal de prueba colocado dentro de la jaula para animales;
aislar una pluralidad de ácidos nucleicos de la muestra de prueba, en donde la pluralidad de ácidos nucleicos es representativa de uno o más patógenos;
- 5 amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos; y
analizar los ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de un patógeno,
en donde el polvo de aire ambiental se libera por agitación del lecho sucio por el animal de prueba, y
en donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape.
- 10 16. El método de la reivindicación 15, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende al menos uno de amplificación isotérmica mediada por bucle y reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- 15 17. El método de la reivindicación 16, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende PCR seleccionada del grupo que consta de PCR de punto final y PCR en tiempo real.
- 20 18. El método de la reivindicación 17, en donde:
aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende extraer una muestra de ARN de la muestra de prueba y transcribir de forma inversa la muestra de ARN extraída en una muestra de ADNc;
amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende amplificar la muestra de ADNc por PCR en tiempo real; y
analizar los ácidos nucleicos amplificados comprende medir un valor de Ct de la muestra de ADNc amplificada.
- 25 19. El método de la reivindicación 17, en donde:
aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende extraer una muestra de ADN de la muestra de prueba;
amplificar al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende amplificar la muestra de ADN por PCR en tiempo real; y
analizar los ácidos nucleicos amplificados comprende medir un valor de Ct de la muestra de ADN amplificada.
- 30 20. El método de la reivindicación 17, en donde la amplificación de al menos uno de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende PCR y en donde el análisis de los ácidos nucleicos amplificados comprende análisis de tiempo de vuelo de productos de PCR.
- 35 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en donde la muestra de prueba comprende polvo de aire ambiental capturado del flujo de aire durante un período de tiempo de al menos 2 semanas.
- 40 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en donde el polvo de aire ambiental se libera por un dispositivo de accionamiento en comunicación mecánica con el recinto.
- 45 23. El método de la reivindicación 22, en donde el recinto no contiene un animal durante la captura del polvo de aire ambiental.
- 50 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-23, en donde el uno o más patógenos se seleccionan del grupo que consta de: *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Spironucleus spp.*, Norovirus murino, *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp. beta-hemolítico*
- 55 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-24, en donde aislar la pluralidad de ácidos nucleicos comprende al menos uno de aislamiento magnético, aislamiento de ácido nucleico basado en columna, métodos de extracción orgánica, y lisis alcalina.
- 60 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-25, en donde el medio de recolección comprende un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.
- 65 27. El método de la reivindicación 26, en donde el medio de recolección posee una eficiencia seleccionada dentro del intervalo entre 5 % y 40 %.
28. El método de la reivindicación 26, en donde el medio de recolección es un filtro graduado.
29. Un sistema para recolectar polvo de aire ambiental generado dentro de un sistema de jaula para animales de estudio, que comprende:
un recinto sellable de manera reversible, que incluye:
una cámara adaptada para recibir una jaula para alojar un animal, la jaula que está en comunicación para fluidos con la cámara;
una toma de aire acoplable con un suministro de aire; y
un retorno de aire acoplable con una fuente de vacío;

- en donde una porción de un flujo de aire suministrado dirigido a través de la cámara, desde la entrada de aire al retorno de aire, pasa a través de al menos una porción de la jaula cuando se recibe en la cámara y es suficiente para transportar una porción de polvo de aire ambiental contenido dentro de la jaula recibida al retorno de aire;
- 5 un dispositivo de accionamiento en comunicación mecánica con el recinto, el dispositivo de accionamiento operable para agitar los contenidos de la jaula cuando se reciben dentro de la cámara; y
- medio de recolección de filtración de aire adecuado para capturar al menos una porción del polvo de aire ambiental transportado por un flujo de aire dirigido a través de la cámara,
- 10 en donde el medio de recolección de filtrado de aire se coloca dentro de un pleno de escape en comunicación para fluidos con e intermedia entre la cámara y la fuente de vacío, y
- en donde una superficie del medio de recolección se orienta en un ángulo agudo dentro del intervalo de 15° a 25° con respecto a una dirección del flujo de aire dentro del pleno de escape.
30. El sistema de la reivindicación 29, en donde el medio de recolección se coloca con respecto al recinto tal que al menos una porción del flujo de aire incida en el medio de recolección después de pasar a través de la jaula.
- 15 31. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 29-30, en donde el medio de recolección se coloca dentro del recinto y fuera de la jaula.
32. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 29-31, en donde el medio de recolección se coloca con respecto al recinto tal que al menos una porción del flujo de aire incida en el medio de recolección después del pasaje a través del retorno de aire.
- 20 33. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 29-32, en donde el medio de recolección comprende un filtro seleccionado del grupo que consta de filtros mecánicos, filtros químicos, filtros electrostáticos, y depuradores húmedos.
- 25 34. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en donde el dispositivo de accionamiento se puede operar para mover de manera reversible el recinto al menos uno de a manera de traslación y rotacionalmente con respecto a una posición inicial.
- 30 35. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el dispositivo de accionamiento es un dispositivo ultrasónico.

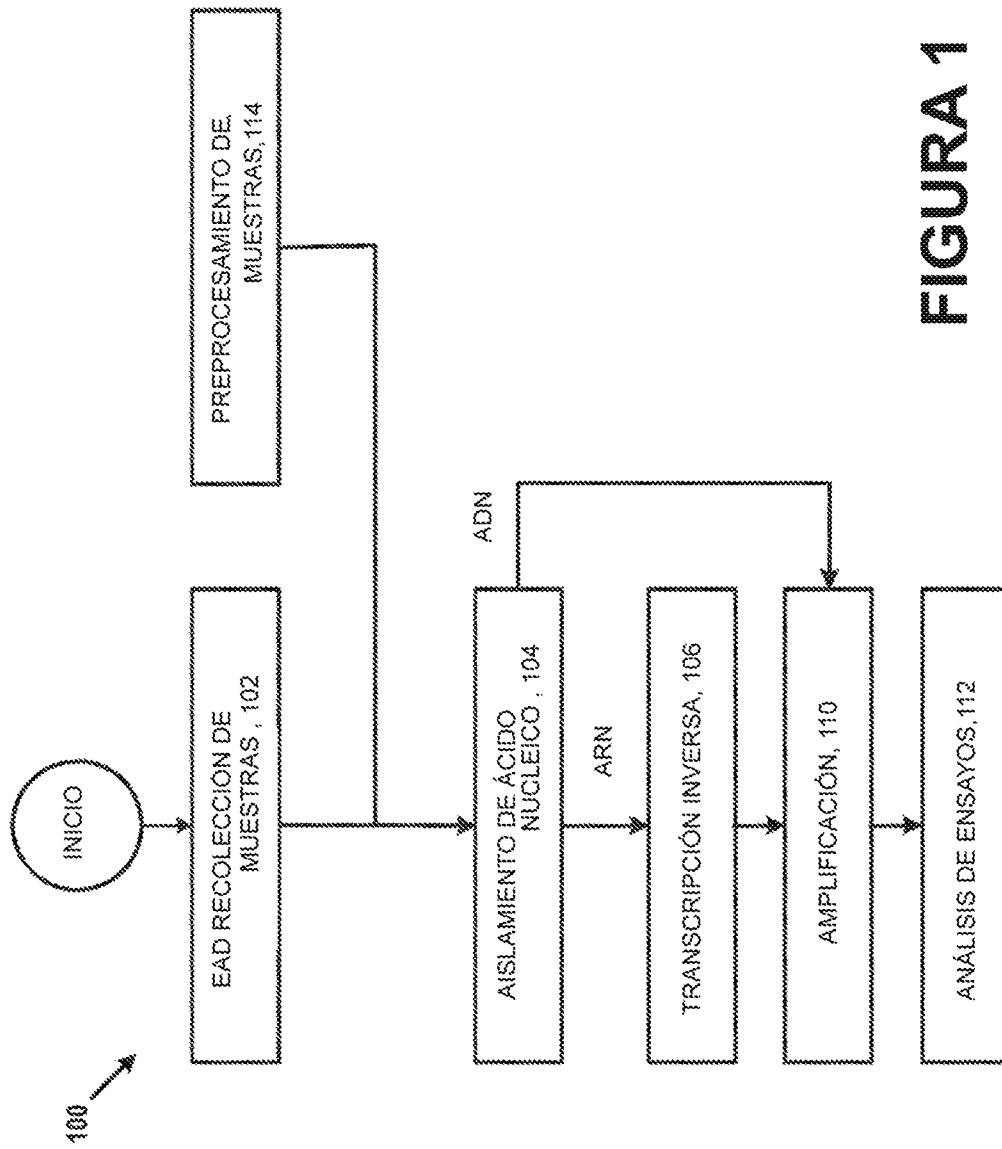


FIGURA 1

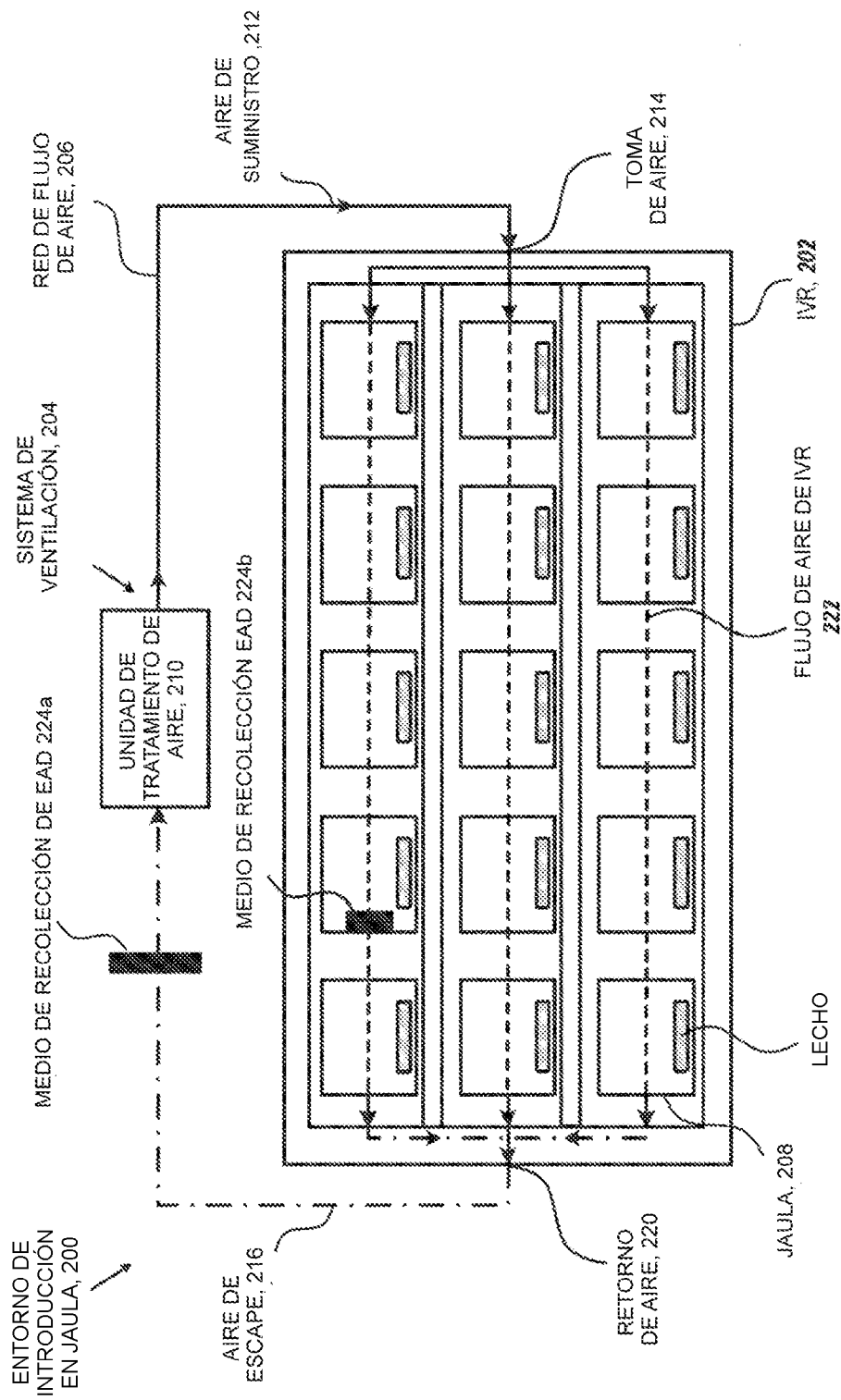
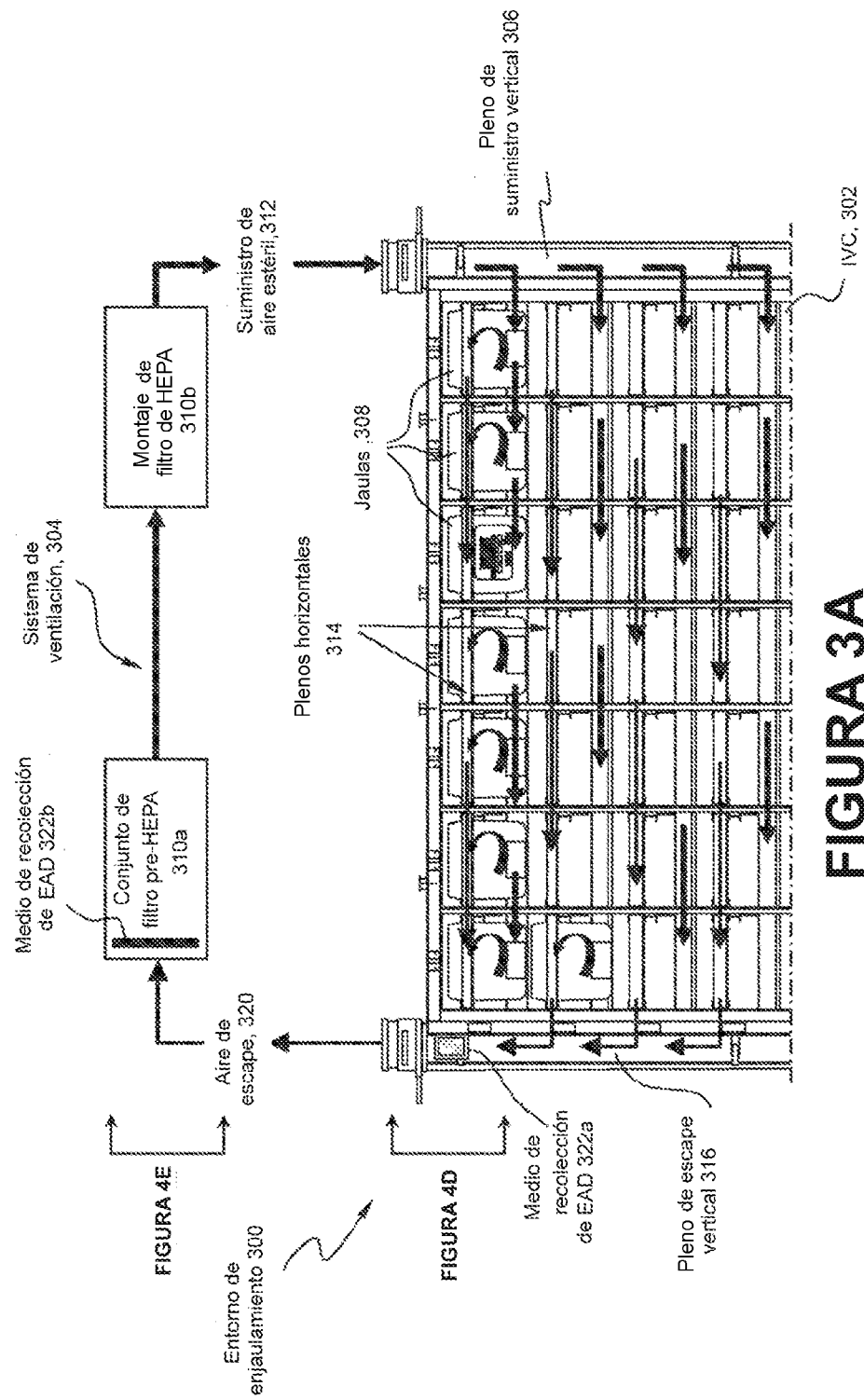


FIGURA 2



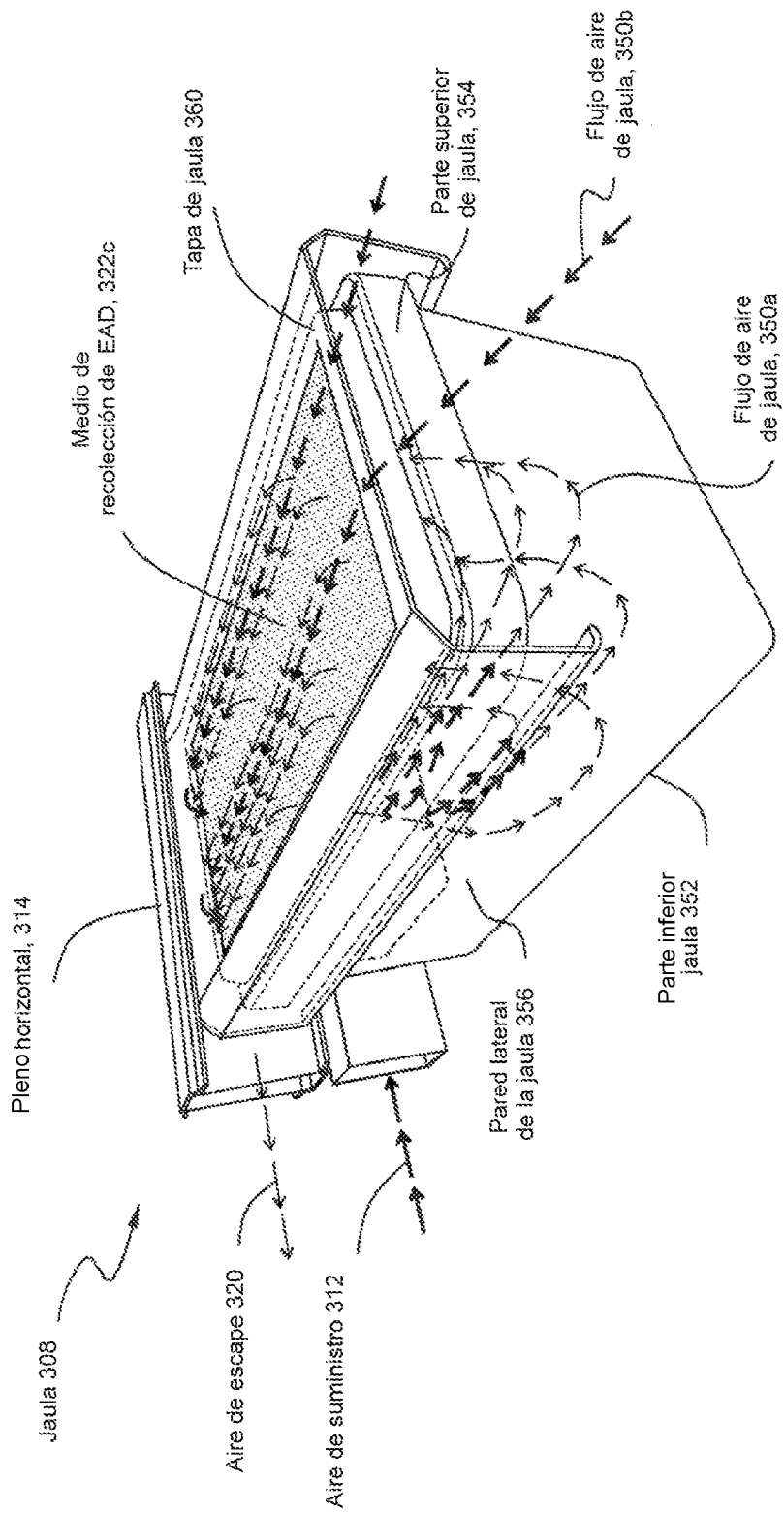


FIGURA 3B

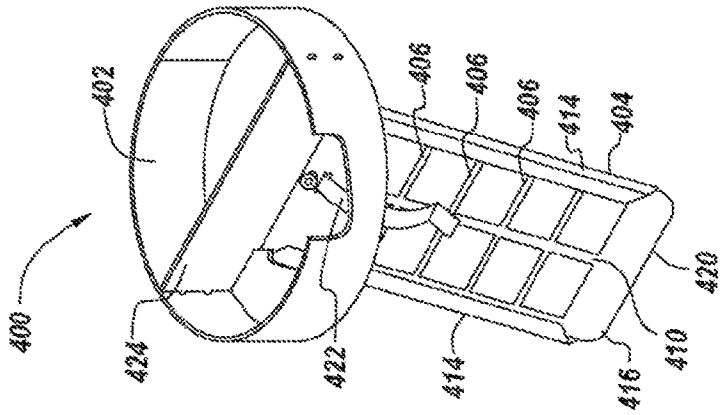


FIGURE 4C

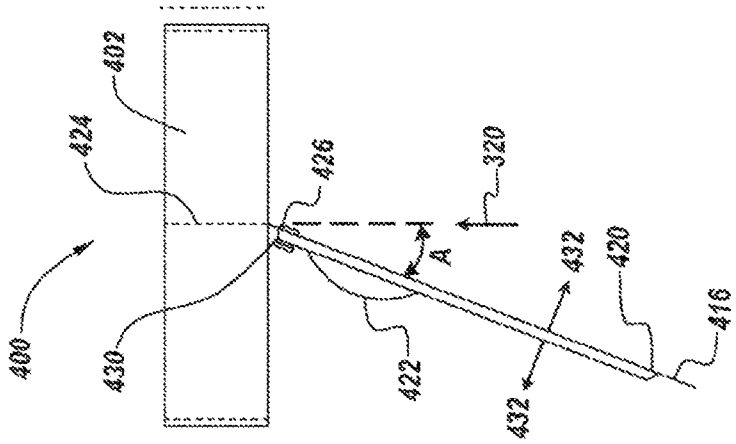


FIGURE 4B

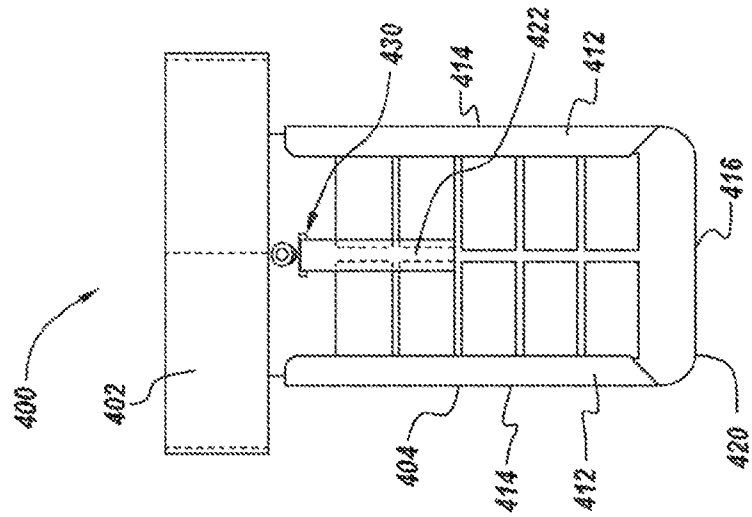


FIGURE 4A

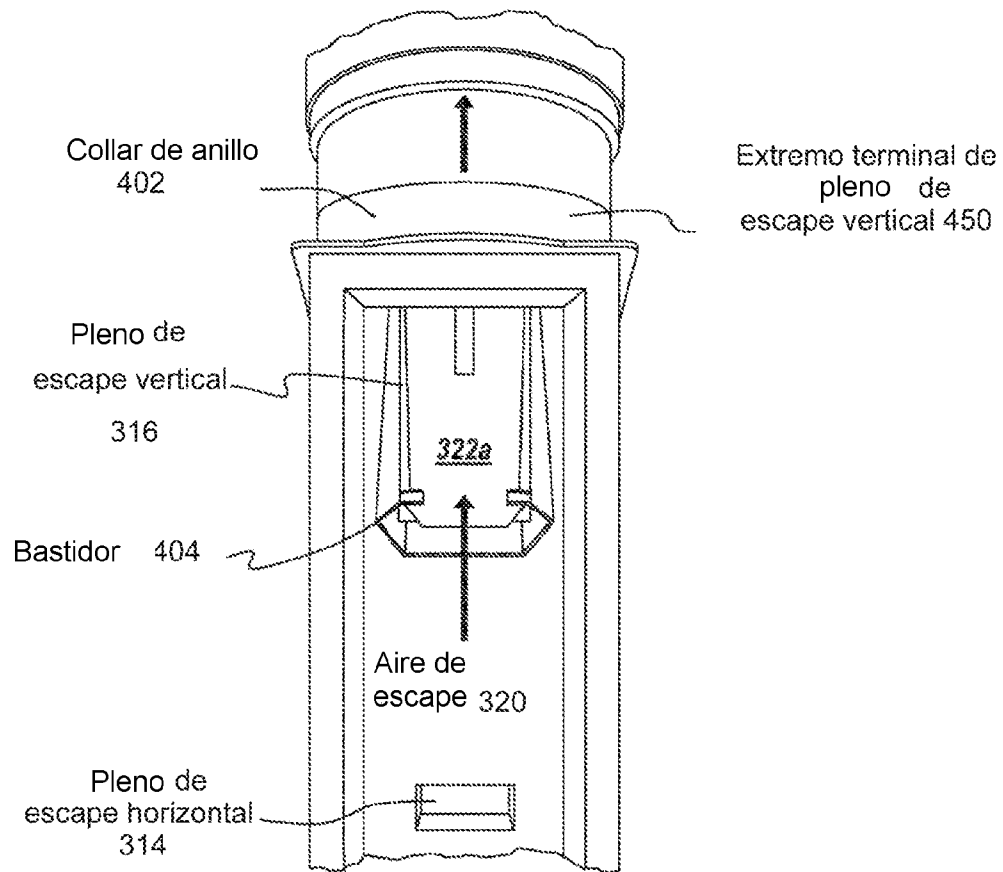
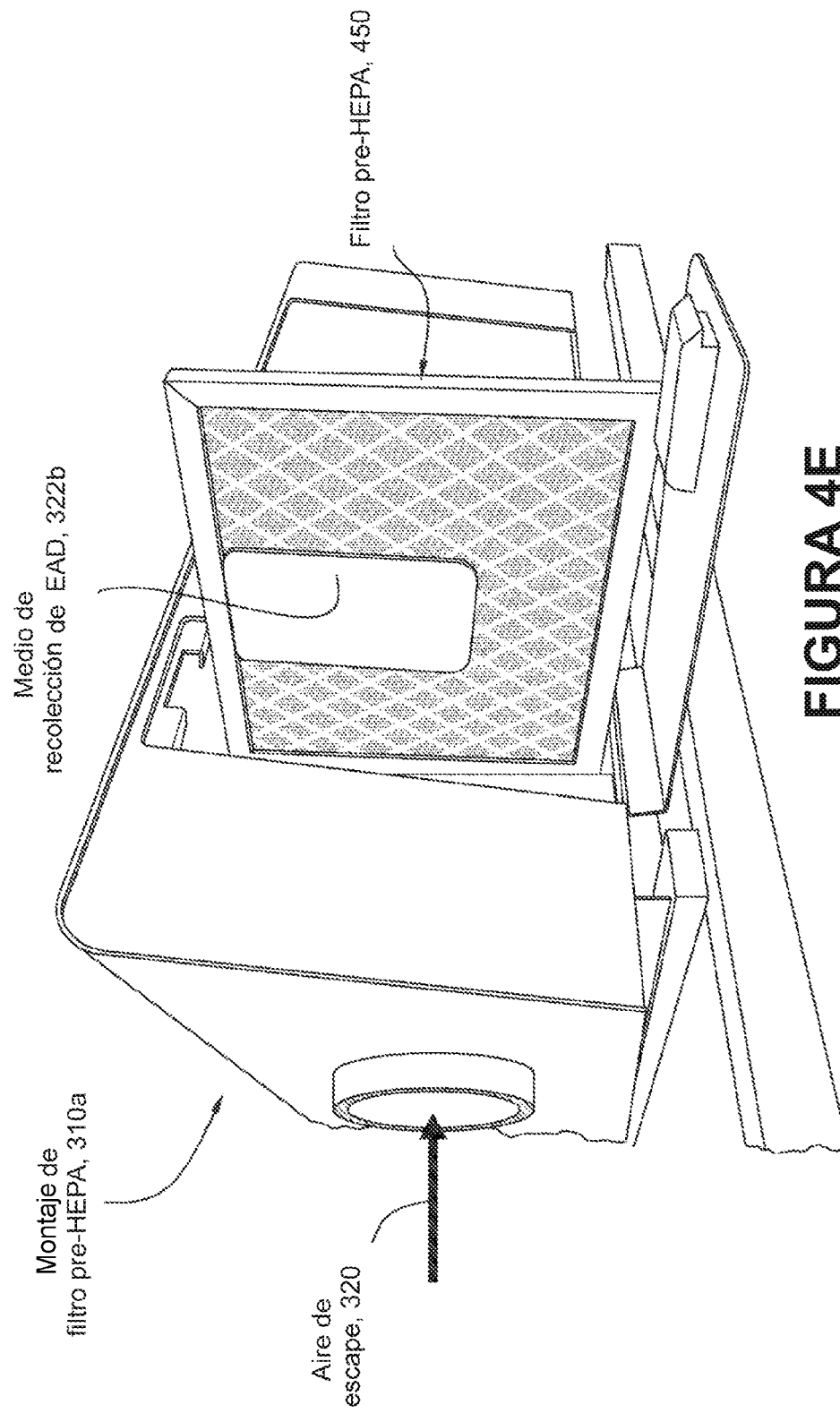


FIGURA 4D



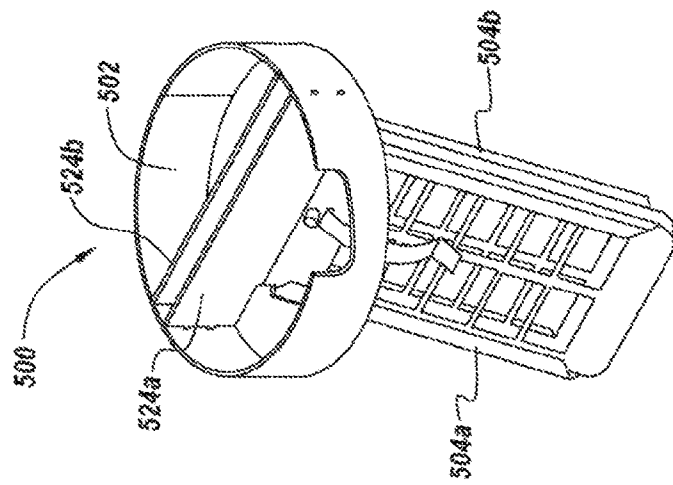


FIGURE 5A

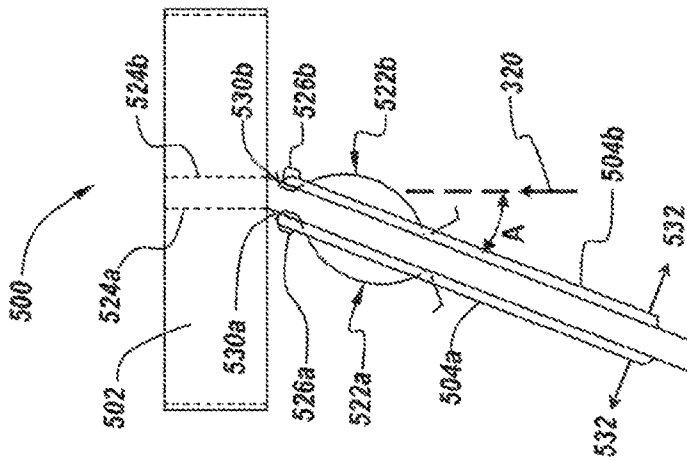


FIGURE 5B

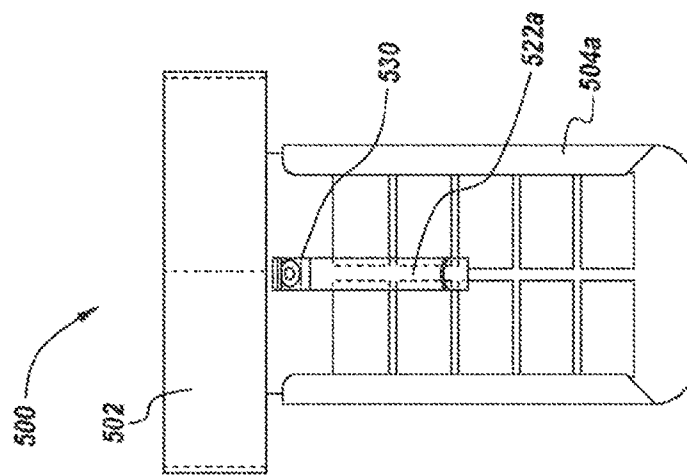


FIGURE 5C

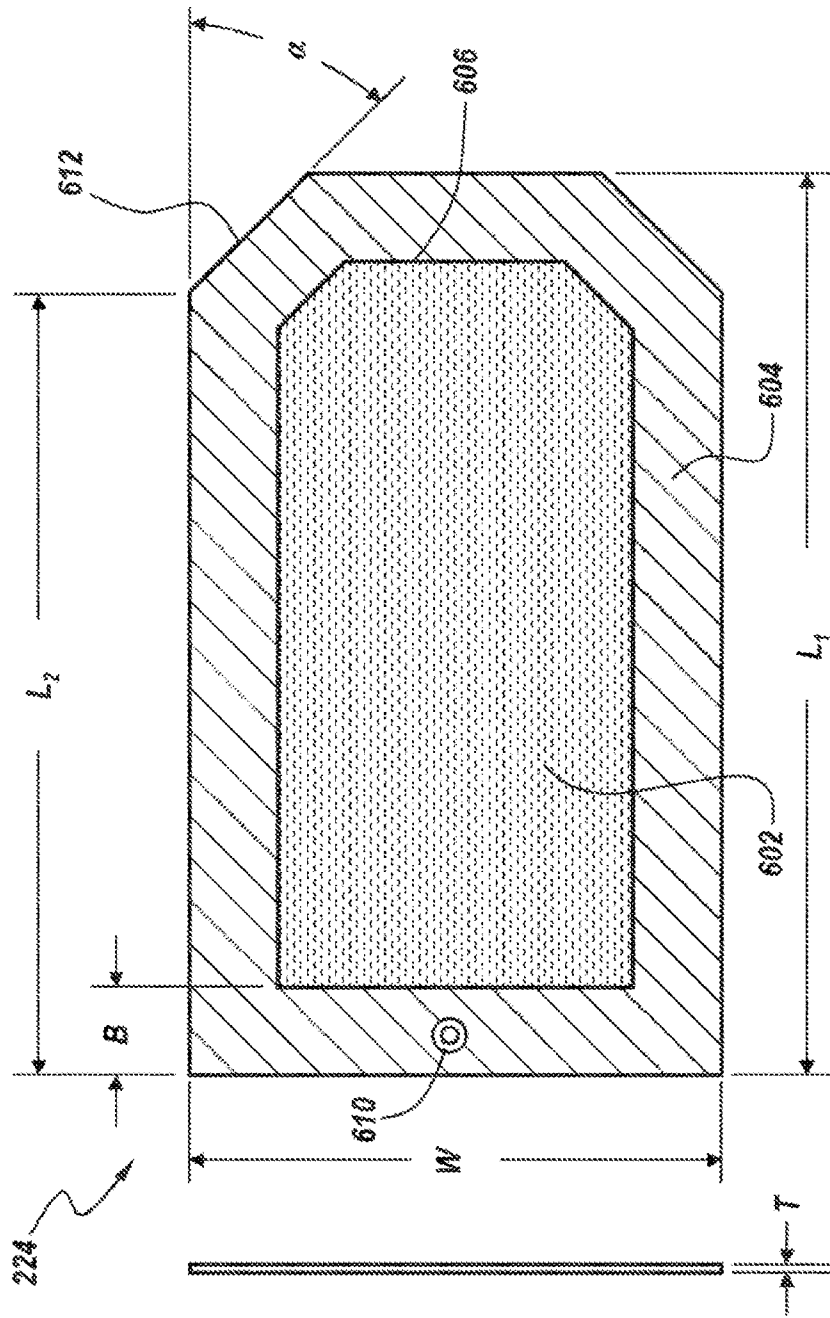
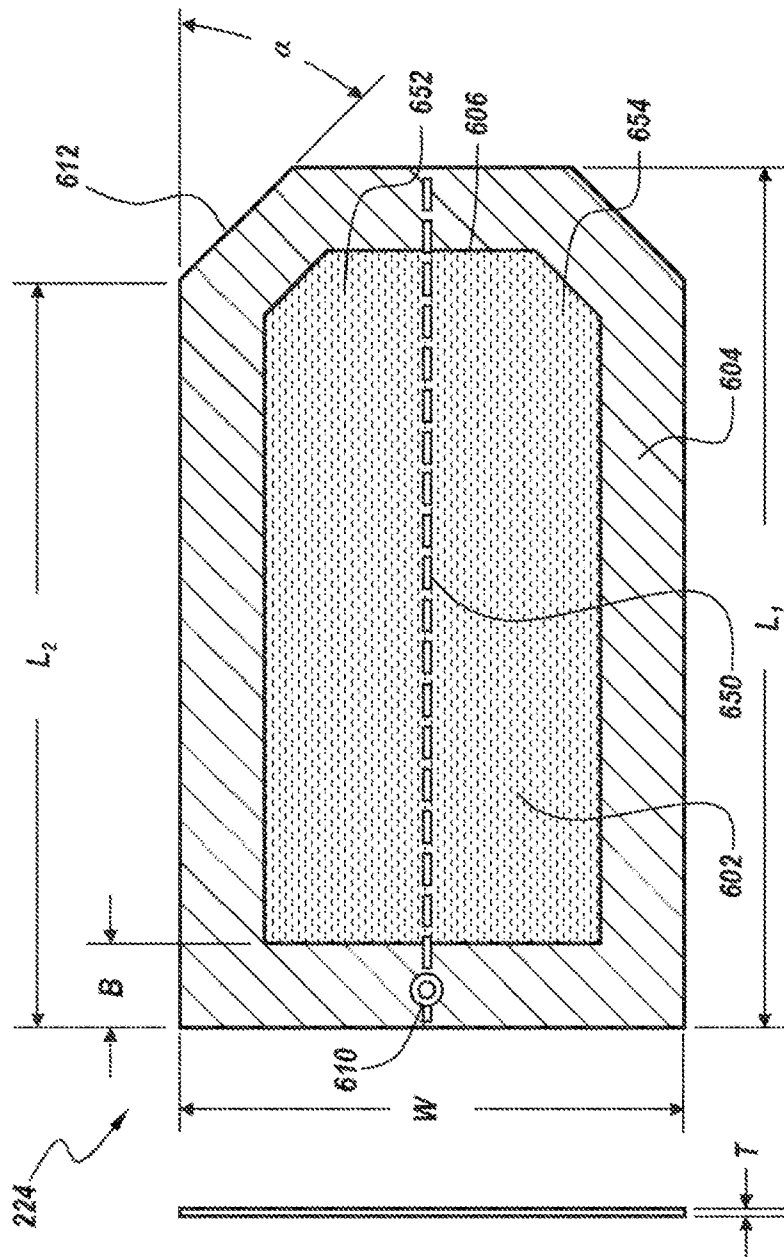


FIGURA 6A



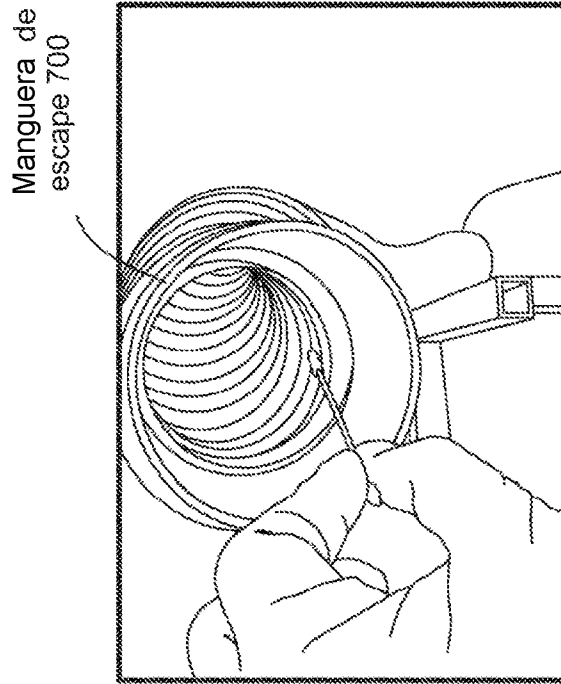


FIGURA 7B

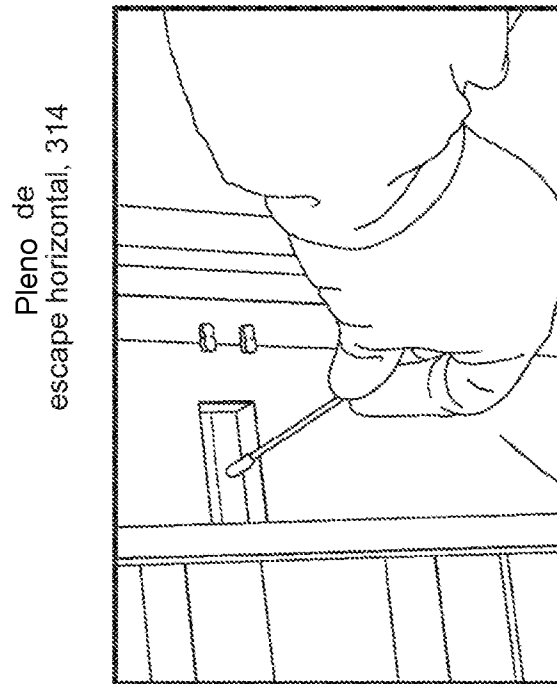


FIGURA 7A

Pleno de escape vertical, 316

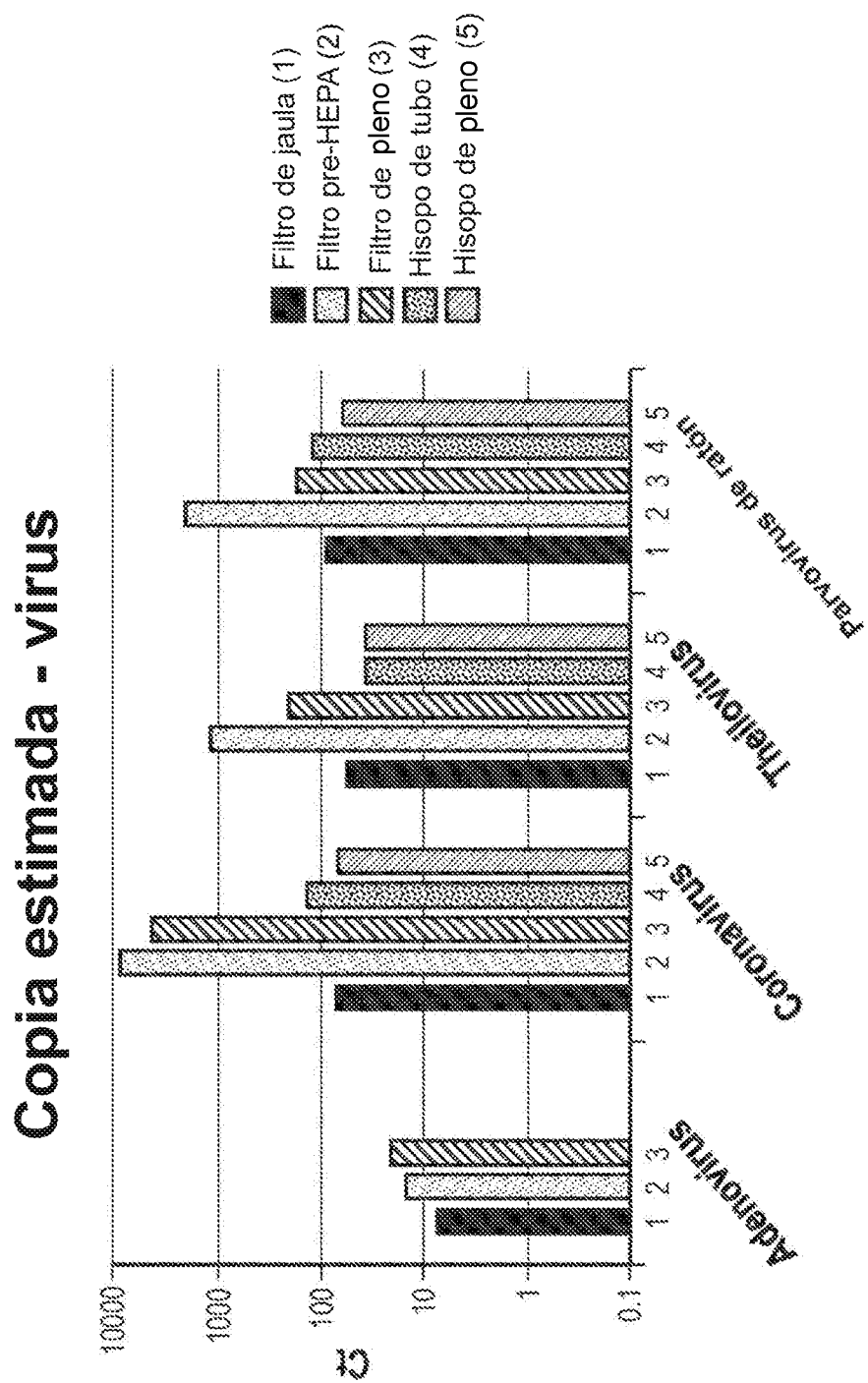


FIGURA 8A

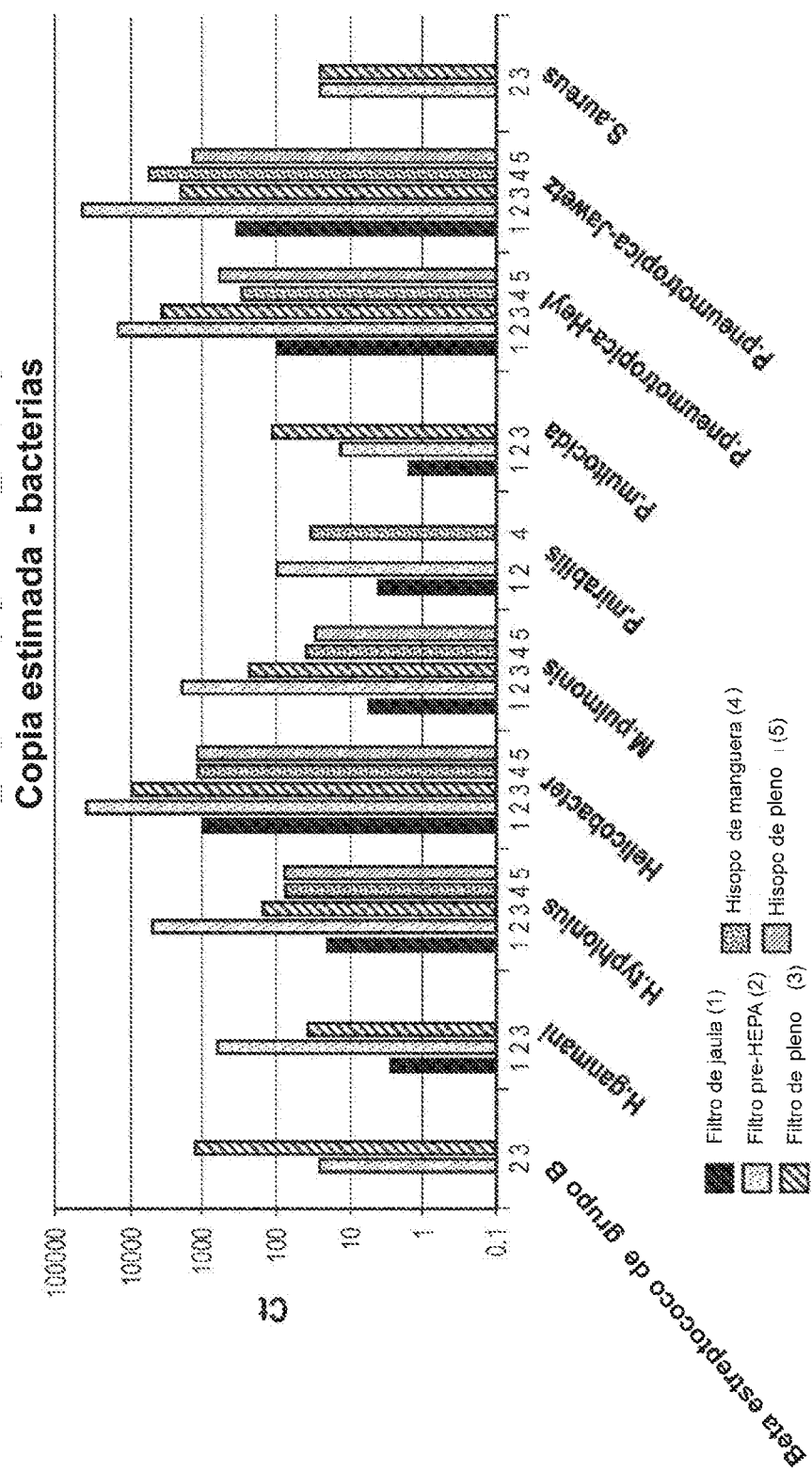


FIGURA 8B

Copia estimada - Parásitos Protozoos

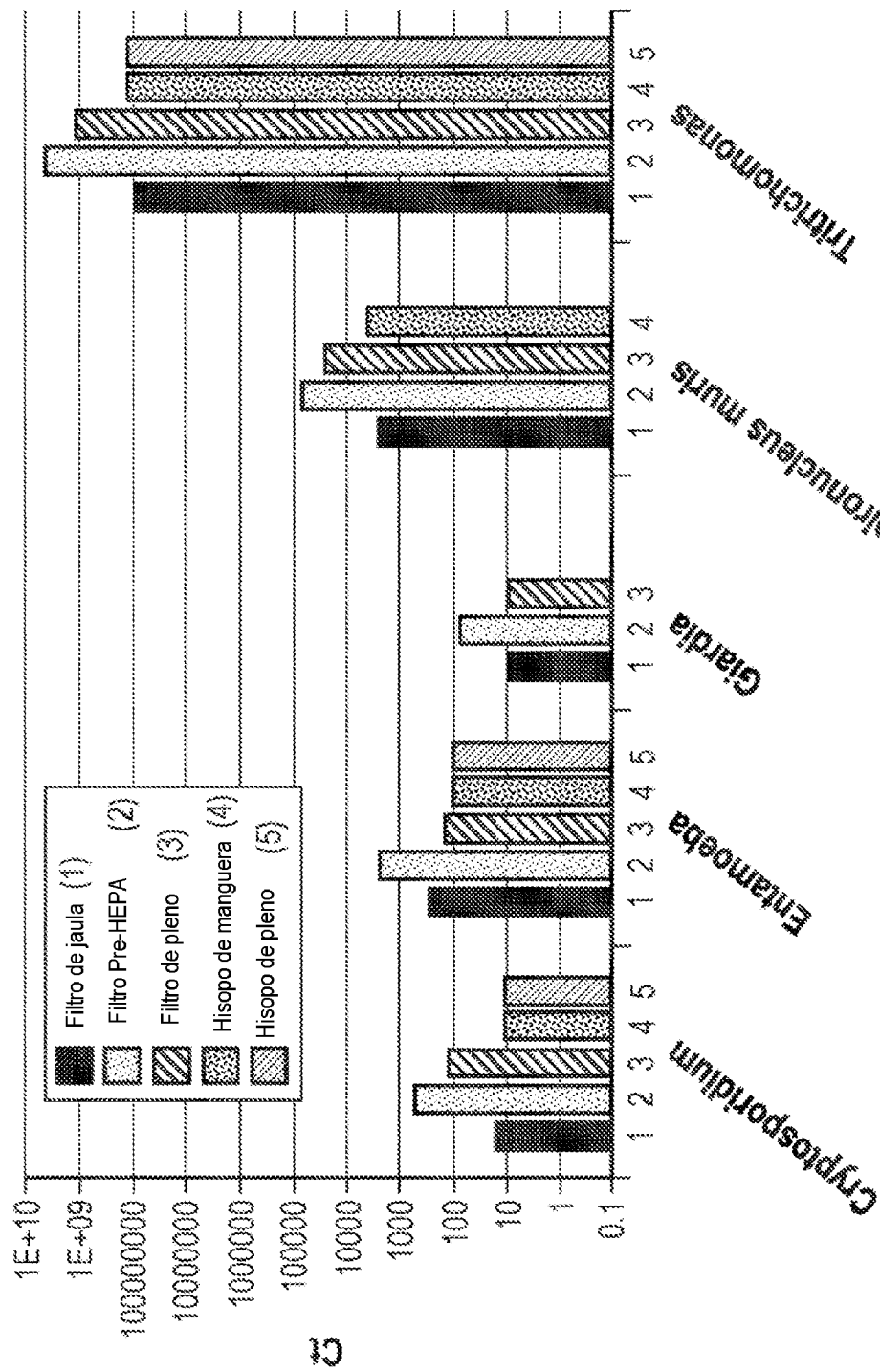


FIGURA 8C

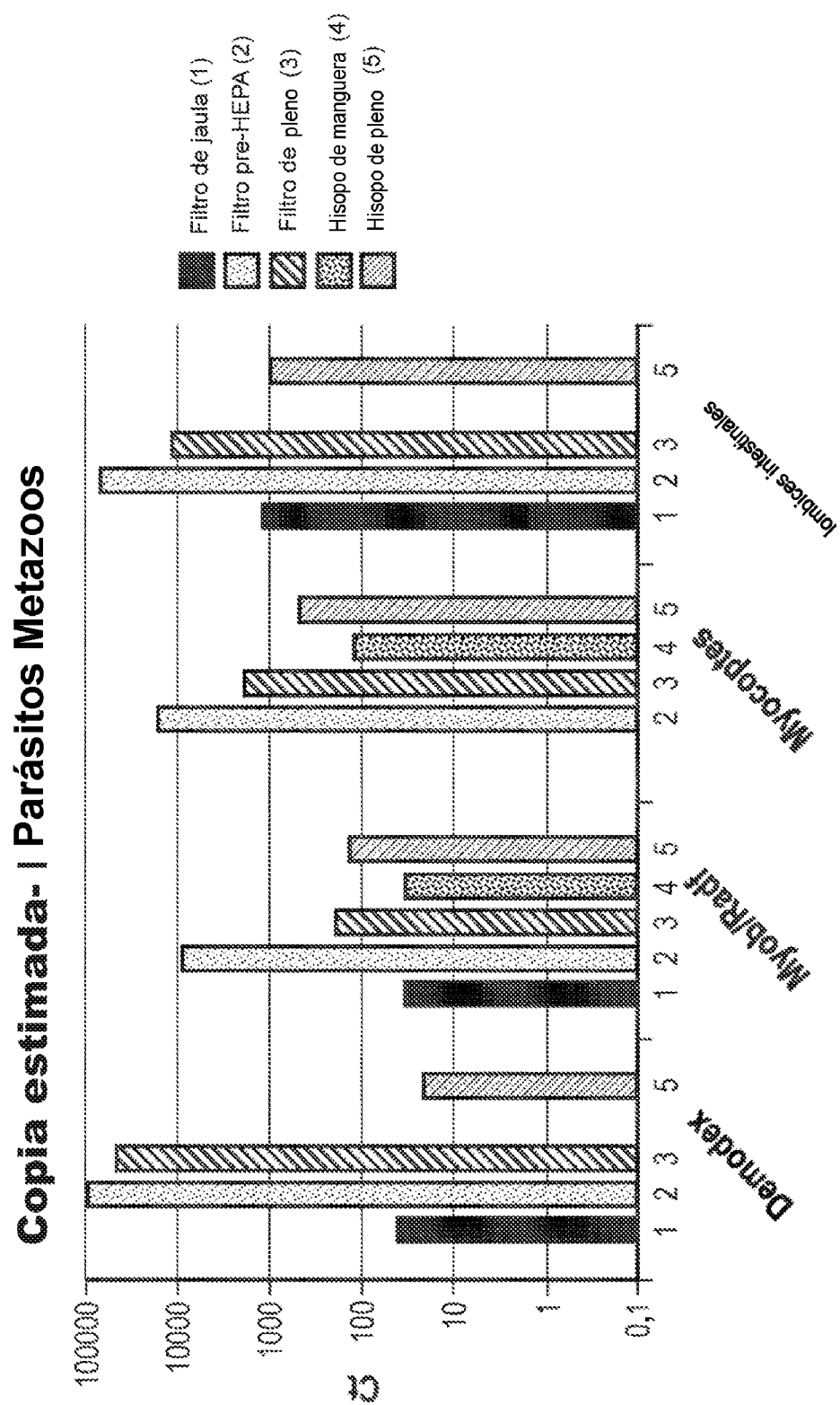


FIGURA 8D

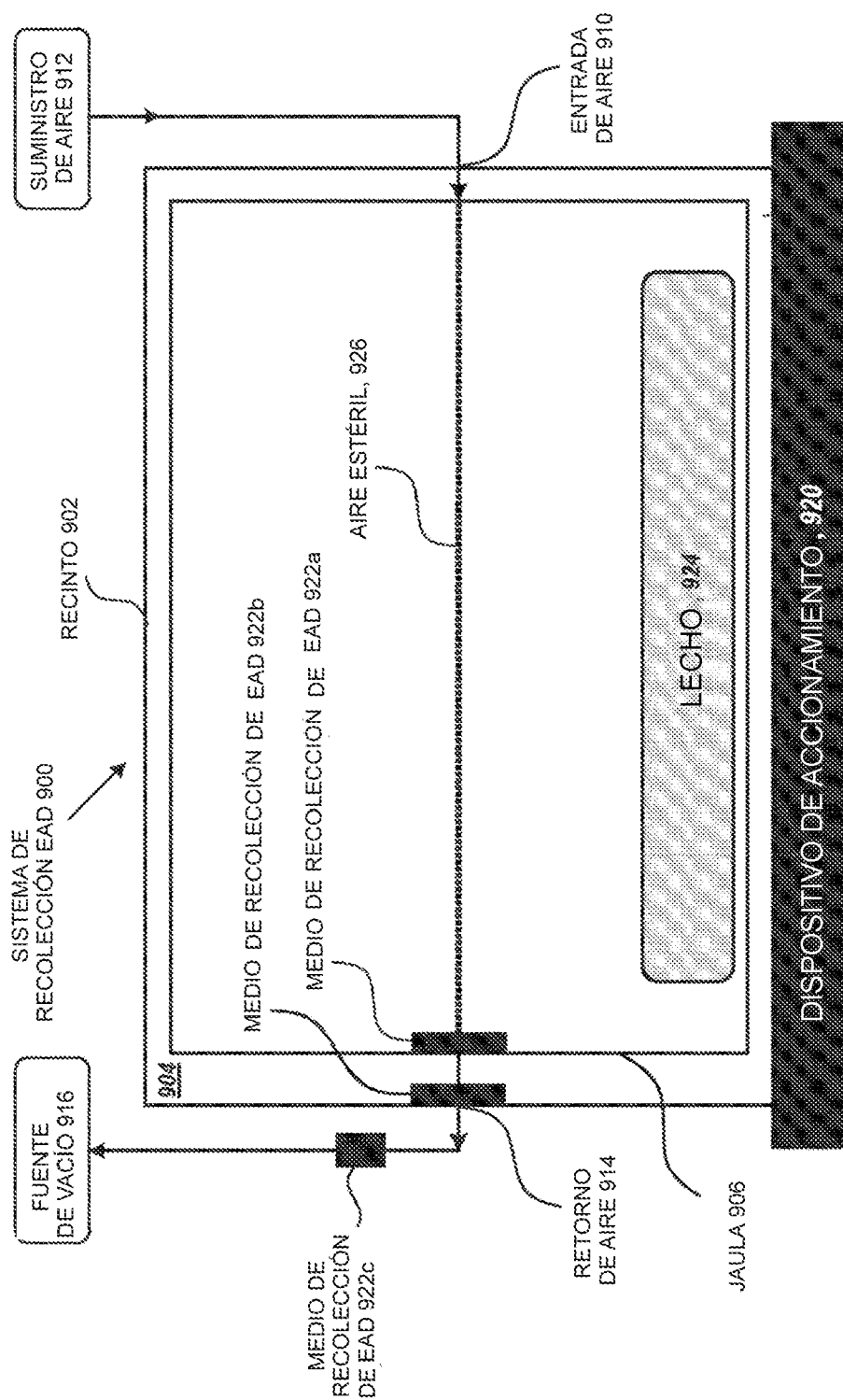


FIGURA 9