



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 929**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02003203 .3**

(86) Fecha de presentación : **19.02.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1236513**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.09.2002**

(54) Título: **Control de flujo de líquido en una matriz de ensayo biológico.**

(30) Prioridad: **28.02.2001 US 795823**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

(73) Titular/es: **DADE BEHRING Inc.**
1717 Deerfield Road
Deerfield, Illinois 60015, US

(72) Inventor/es: **Farina, Edward Francis;**
Ferguson, Samuel Garfield, Jr.;
Gebrian, Peter Louis;
Krufka, Frank Stephen;
Mazza, John Charles y
Shmel, Nicholas Michael, Jr.

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Control de flujo de líquido en una matriz de ensayo biológico.

La presente invención se refiere a matrices de ensayo microbiológico, adecuados para uso en analizadores automatizados que emplean un portador para transportar tales matrices entre diversas estaciones funcionales. Más particularmente, la presente invención proporciona una matriz de ensayo que tiene un orificio sellable de vacío, para facilitar el control de un flujo de una solución líquida desde un depósito sobre la matriz hasta varios micropocillos sobre la misma, y un pocillo sacrificial para proteger la integridad de la solución dentro de los micropocillos.

Se pueden realizar diversos tipos de ensayos relacionados con la diagnosis y el tratamiento de pacientes por análisis de una muestra biológica. Se toman muestras biológicas que contienen los microorganismos de un paciente a partir de fluidos corporales, de infecciones o abscesos del mismo y se colocan típicamente en paneles o matrices de ensayo, combinados con diversos reactivos, incubados y analizados para ayudar al tratamiento del paciente. Se han desarrollado analizadores bioquímicos automatizados para cumplir las necesidades de los centros sanitarios y de otras instituciones, a fin de facilitar el análisis de muestras de pacientes y mejorar la precisión y fiabilidad de los resultados de los ensayos, cuando se les compara con los análisis que usan operaciones manuales. Sin embargo, con géneros bacterianos siempre cambiantes y antibióticos de nuevo descubrimiento, la demanda de pruebas bioquímicas ha aumentado tanto en complejidad como en volumen. Debido a estas mayores demandas, en unión con el gasto y la escasez de superficie útil en las instituciones sanitarias y la presión para proporcionar resultados clínicos a bajo coste, se ha hecho importante realizar simultáneamente diversos tipos de ensayos bioquímicos en un analizador altamente automatizado y compacto que funciona con una mínima atención clínica, usando técnicas eficaces económicamente.

Una familia importante de analizadores microbiológicos automatizados funciona como una herramienta de diagnóstico para determinar tanto la identidad de un microorganismo infectante como la de un antibiótico eficaz para controlar el crecimiento del microorganismo. Al realizar estos ensayos, se establecen los patrones de identificación y susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de microorganismos aislados de muestras biológicas. Tales analizadores han colocado históricamente productos bioquímicos seleccionados en una pluralidad de pequeños pocillos de ensayo para muestras en paneles o matrices que contienen diferentes medios de crecimiento, o medios antimicrobianos en diluciones en serie. Se determinan la identificación (ID) de microorganismos y de concentraciones mínimas de inhibidores (MIC) de un antibiótico eficaz contra el microorganismo por cambios de color, por cambios de fluorescencia o por el grado de enturbiamiento (turbidez) en los pocillos de ensayo para muestras creados en las matrices. Examinando los patrones de señal generados, tanto las mediciones MIC e ID como los análisis posteriores se realizan gracias a analizadores microbiológicos controlados por ordenador para proporcionar ventajas en reproducibilidad, en reducción del tiempo de tratamiento, en evitar errores de transcripción y en una estandarización para

todos los ensayos ejecutados en el laboratorio.

En una prueba ID de un microorganismo, se prepara primero una dilución estandarizada de la muestra de microorganismos de un paciente, conocida como un inóculo, a fin de proporcionar una suspensión bacteriana o celular que tiene una concentración conocida predeterminada. Este inóculo se coloca en una matriz o panel de ensayo analítico que tiene varios micropocillos, o alternativamente en un montaje de rotor de cubetas que tiene un pocillo receptor de inóculo, desde donde se distribuye la muestra por fuerza centrífuga a varios pocillos o cámaras de ensayo en la periferia del rotor. Los pocillos de ensayo contienen medios de identificación, que consisten en sustratos y/o inhibidores del crecimiento que, dependiendo de las especies de microorganismos presentes, presentarán cambios de color, aumentos en la turbidez o cambios en la fluorescencia después de la incubación. Por ejemplo, se pueden identificar unos géneros bacterianos en base a los cambios de pH, a su capacidad para utilizar diferentes compuestos de carbono o al crecimiento en presencia de agentes antibióticos en un pocillo de ensayo. Algunos ensayos requieren la adición de reactivos para detectar productos del metabolismo bacteriano, mientras que otros son autoindicativos. En paneles cromogénicos convencionales, el inóculo se incuba de unas 18-24 horas antes de que se complete el análisis. Alternativamente, se puede conseguir una ID de microorganismo usando rápidas matrices de ensayo fluorogénico, que emplean medios de crecimiento independiente, en los que un sustrato preformado de enzimas se coloca en los pocillos de ensayo y se realizan ensayos fluorogénico, basándose en la detección de hidrólisis de sustratos fluorogénicos, la utilización de sustratos que siguen los cambios de pH, la producción de sustratos metabólicos específicos y el régimen de producción de subproductos metabólicos específicos después de aproximadamente 2 horas de incubación. En ambos casos, examinando la reacción del inóculo y los reactivos después de la incubación y durante un periodo de tiempo, o la falta de ella, y comparando la reacción con la de especies conocidas, se pueden identificar los tipos de microorganismos.

Son también bien conocidos el uso de bandejas de ensayo microbiológico y las técnicas empleadas en los ensayos MIC, también denominadas pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, AST, de microorganismos. Los ensayos AST son esencialmente ensayos de susceptibilidad a una dilución de caldo, usando pocillos llenos de inóculo y un caldo de crecimiento, denominada en esta memoria una solución de inóculo-caldo, y concentraciones crecientes de varios antibióticos diferentes, o agentes antibióticos. Los diferentes agentes antibióticos se diluyen típicamente en caldo Mueller-Hinton con calcio y magnesio en paneles cromogénicos, o se diluyen en agua esterilizada en autoclave con un compuesto fluorogénico en paneles fluorogénicos. Los antibióticos se diluyen hasta concentraciones que incluyen las de interés clínico. Después de la incubación, la turbidez o fluorescencia será menor, o no existente, en pocillos en los que se ha inhibido el crecimiento gracias a los medios antimicrobianos en esos pocillos. El analizador compara cada lectura del pocillo de ensayo con un valor umbral. El valor umbral es un número fijo correspondiente a un cierto porcentaje de absorbencia o fluorescencia relativa, que corresponde a un crecimiento clínicamente significativo. La MIC de cada agente antibiótico se

mide directamente como crecimiento visible, o indirectamente como un aumento de fluorescencia.

Los desafíos importantes que se deben tomar en consideración cuando se diseñan analizadores bioquímicos automatizados económicamente eficaces incluyen el volumen de reactivos requerido por ensayo y el coste del panel de ensayo desechable, de la matriz o, en ciertos diseños, de un rotor centrífugo de ensayo. Puesto que son pequeños y se pueden producir usando fabricación en serie, técnicas de moldeo por inyección de plástico, es ventajoso usar matrices de ensayo de tamaño muy pequeño, semejante a los de la presente invención, que tienen varios micropocillos para realizar ensayos AST a fin de facilitar una manipulación automática y minimizar el gasto de una matriz de ensayo desechable. Las matrices de ensayo AST consisten, típicamente, en una pluralidad de micropocillos adyacentes alineados en algún tipo de matriz que funciona como recipiente de reacción, para las reacciones bioquímicas anteriormente mencionadas, que implican unos medios de fase sólida y una fase líquida que contiene una muestra a ensayar. Una parte alícuota de la muestra se coloca en cada micropocillo, junto con reactivos antibióticos apropiados. La prueba AST requiere usualmente que las bandejas de ensayo sean incubadas a una temperatura controlada durante un periodo de tiempo tal que ocurra una reacción observable entre la muestra y el reactivo, a intervalos de tiempo predeterminados, cada micropocillo de la bandeja de ensayo se examina para una indicación de variaciones en el cambio de color, la turbidez o el tamaño.

Llenando el número de micropocillos con el inóculo y/o los reactivos requeridos presenta varios desafíos técnicos que se han hecho crecientemente difíciles, a medida que se reduce el tamaño de los micropocillos. Estos desafíos incluyen proporcionar una uniformidad de llenado, mantener una ausencia de burbujas de aire que impiden las observaciones de ensayo, controlar los efectos perjudiciales de la evaporación, mantener la integridad de las observaciones de ensayo, etc. Se han hecho esfuerzos para tratar estos desafíos, junto con otros problemas, y éstos emplean generalmente una técnica al vacío en el llenado de micropocillos dentro de una matriz de ensayo a través de un número interconectado de canales de tamaño micro, conectados entre los micropocillos y un depósito de inóculo.

La patente de EE.UU. número 5.932.177 proporciona una placa de muestras de ensayo como se usa típicamente en los análisis bioquímicos, que tiene varios pocillos para muestras con forma rectangular del mismo tamaño y flujo de fluido por medio de una pluralidad de canales pasantes, que encaminan el flujo de fluido de las muestras a lo largo de ambas superficies delantera y trasera de la placa. Se disponen trampas elevadas de burbujas, en la medida que son ranuras de interrupción integrales, para detectar la posición y alineación de la placa.

La patente de EE.UU. número 5.922.593 describe un panel de ensayo microbiológico, que tiene una pluralidad de copas translúcidas que se extienden desde un primer lado de una superficie plana, y un bastidor, que tiene una pluralidad de tubos de extremo abierto formados en el bastidor. El bastidor incluye una pluralidad de paredes de paso levantadas en un segundo lado de la superficie plana, que forman conductos de paso sobre las aberturas en los extremos inferiores de

los tubos. Un extremo del conducto de paso tiene una abertura para permitir que un inóculo circule a través del conducto de paso. El bastidor comprende además un orificio de comunicación de aire formado como un tubo de extremo abierto, que se extiende desde el segundo lado de la superficie plana.

La patente de EE.UU. número 5.766.553 describe una placa de muestras de ensayo moldeada, que comprende un orificio de entrada de fluido, unas regiones extremas primera y segunda y unas regiones laterales primera y segunda. Una pluralidad de pocillos de crecimiento o de reacción está situada en el cuerpo de placa entre las regiones extremas primera y segunda y las regiones laterales primera y segunda. Una red de canales de fluido conecta el orificio de entrada de fluido a dichos pocillos de crecimiento. Para mejorar el flujo del material durante el procedimiento de moldeo, se disponen regiones ahuecadas en al menos una de las regiones extremas primera y segunda y las regiones laterales primera y segunda.

La patente de EE.UU. número 5.746.980 describe una placa de muestras de ensayo con un orificio de admisión de fluido y unos pocillos para muestras dispuestos entre sus superficies opuestas. Una red de canales de fluido conecta el orificio de admisión de fluido a los pocillos para muestras, y una trampa de burbujas está conectada al menos a uno de los pocillos para muestras por una canalización, que está formada en dicha primera superficie de la placa. La trampa de burbujas está formada como una depresión, que se extiende en forma parcial a través del cuerpo de placa y está cubierta por cinta obturadora.

La patente de EE.UU. número 5.679.310 describe una placa de microvaloración formada por una placa polímera sustancialmente rígida, que tiene una superficie superior sustancialmente plana y una matriz de pocillos cilíndricos o frustocónicos. El fondo de pocillo es impermeable o permeable al fluido. En realizaciones con fondos de pocillo permeables al fluido, se dispone un recinto de vacío debajo de los pocillos para extraer fluido de los mismos a través del material permeable.

La patente de EE.UU. número 5.609.828 describe una placa de muestras con un orificio de admisión y un primer canal de distribución de flujo de fluido conectado al orificio de admisión, para distribuir una muestra de fluido desde el orificio de admisión hasta un primer grupo de pocillos para muestras, y un segundo canal de distribución de flujo de fluido, para distribuir una muestra de fluido desde el orificio de admisión hasta un segundo grupo de pocillos.

La patente de EE.UU. número 4.704.255 describe un cartucho de ensayos que tiene una placa de base sustancialmente rectangular, una placa superior sustancialmente rectangular y cuatro paredes laterales. La placa superior tiene una pluralidad de pocillos de reacción en su lado superior. Un orificio a través de la placa de base permite reducir la presión en el depósito de desechos, con relación a la presión en los pocillos, para extraer la fase líquida de una reacción del pocillo a través del filtro y hacia dentro del depósito de desechos.

De esta descripción, se puede ver que sigue habiendo una necesidad de una bandeja de ensayo que resuelva simple y económicamente los desafíos técnicos anteriormente descritos. En particular, hay una necesidad de una matriz sencilla y económica de ensayo microbiológico, en el que todos los pocillos de

ensayo contenidos en él se puedan llenar fácil y convenientemente de una muestra microbiológica para la prueba AST, sin introducir etapas de llenado complicadas. Hay una necesidad adicional de una matriz sencilla de ensayo microbiológico adaptada para minimizar los efectos perjudiciales de las burbujas de aire dentro de una solución de ensayo durante una prueba óptica. Incluso hay una necesidad adicional de una matriz sencilla de ensayo microbiológico, en el que la integridad de la solución de ensayo en un micropocillo lleno se pueda mantener frente a los efectos perjudiciales de la evaporación.

La presente invención cumple las necesidades anteriores disponiendo una matriz de ensayo microbiológico, que tiene una pluralidad de micropocillos llenados previamente de cantidades conocidas de antibióticos diferentes, que se pueden llenar fácil y convenientemente de muestra y usar para la prueba AST. Una realización particular de la presente invención se dirige a una matriz de ensayo microbiológico con una base superficial inferior generalmente plana, que tiene una pluralidad de micropocillos que sobresalen hacia arriba, teniendo cada micropocillo una parte superior plana, estando conectados los micropocillos por un único microcanal a un depósito abierto formado en una parte superficial superior, generalmente paralela a la base de la matriz de ensayo. El extremo del depósito más cercano a los micropocillos tiene una abertura para permitir que una solución líquida de inóculo-caldo circule desde el depósito a través del microcanal, hasta un pocillo de evaporación sacrificial, que tiene un orificio de purga de aire adaptado para controlar un procedimiento de llenado por vacío y, posteriormente, para ser distribuido a cada uno de la pluralidad de micropocillos. El orificio de purga de aire se mantiene abierto durante un procedimiento de evacuación por vacío, y se cierra después de ello. En una realización a modo de ejemplo, el orificio de purga de aire comprende una abertura termosellable formada en un material plástico fundible. El pocillo de evaporación sacrificial se dispone como un depósito no ensayado desde el que se puede evaporar solución de inóculo-caldo a la atmósfera, protegiendo por ello la solución de inóculo-caldo en los pocillos de ensayo. A fin de minimizar la interferencia óptica durante la prueba, la parte superior central de cada micropocillo está provista de un acabado uniforme. Además, cada micropocillo está provisto de una porción abierta de borde superior opuesta al flujo de la solución líquida entrante de inóculo-caldo, de manera que el aire restante dentro del micropocillo es forzado eficazmente hacia la porción abierta de borde superior y lejos de su porción superior central.

Estas y otras propiedades y ventajas de la presente invención se pueden comprender mejor con referencia a la descripción detallada de las realizaciones preferidas expuestas en lo que sigue tomadas con los dibujos, en los que:

la figura 1 es una vista en planta esquemática simplificada de un analizador microbiológico automatizado, en el que se puede usar la matriz de ensayo de la presente invención;

la figura 2 es una vista en planta desde abajo de la matriz de ensayo de la presente invención;

la figura 2A es una vista desde abajo a escala ampliada de una porción de la matriz de ensayo de la figura 2;

la figura 2B es una vista desde abajo a escala am-

pliada de una porción de la matriz de ensayo de la figura 2;

la figura 3 es una vista en planta desde arriba de la matriz de ensayo de la figura 2;

las figuras 3A y 3B son vistas en corte transversal de la matriz de ensayo de la figura 3;

la figura 4 es una vista lateral en alzado de la matriz de ensayo de la presente invención;

la figura 5A es una vista desde arriba en perspectiva de la matriz de ensayo de la presente invención;

la figura 5B es una vista desde abajo en perspectiva de la matriz de ensayo de la presente invención; y,

la figura 6 es ilustrativa de un procedimiento de llenado de líquido, que usa la matriz de ensayo de la presente invención.

La figura 1 ilustra esquemáticamente un analizador 10 microbiológico automatizado multifuncional, en el que la matriz 12 de ensayo de micropocillos de la presente invención se puede usar para recibir y almacenar reactivos y para soportar reacciones bioquímicas usando muestras de ensayo a ensayar y analizar. Las concentraciones mínimas de inhibidores (MIC) de antibióticos, identificadas también en esta memoria como la prueba de susceptibilidad a los antibióticos (AST), se determinan midiendo el color, la fluorescencia o el grado de turbidez de una reacción bioquímica entre las muestras de ensayo y los diversos antibióticos, que han sido diluidos hasta concentraciones que incluyen aquellas de interés clínico y suministrados a los diferentes micropocillos, dentro de una matriz 12 de ensayo AST durante su fabricación. Se puede adaptar una estación 14 de incubación AST y de medición óptica para efectuar ensayos AST convencionales usando procedimientos conocidos en la técnica.

Una matriz 12 de ensayo AST de micropocillos se puede transportar por todo el analizador 10 usando un sistema de transporte 16 automatizado, que tiene una porción de entrada 18 y una porción de salida 20 situadas en la parte delantera del analizador 10, para los diversos fines descritos en esta memoria. Unas flechas bidireccionales indican la dirección del movimiento a lo largo del sistema de transporte 16. El sistema de transporte 16 comprende tres segmentos independientes adaptados para transportar unos tubos de ensayo 22 apoyados en una gradilla 24 y que contienen un inóculo de microorganismos aislados de especímenes biológicos, y con una concentración de bacterias dentro de un intervalo manejable predeterminado. El sistema de transporte 16 mueve cada gradilla 24 hasta la porción más trasera del analizador 10, en la que un sistema de pipetado 26 trasladable aspira inóculo y dispensa una cantidad predeterminada del mismo en una copa de caldo que tiene una solución conocida de, por ejemplo, caldo Mueller-Hinton. Esta solución de inóculo-caldo se mezcla, se aspira y se dispensa en un depósito, descrito en lo que sigue, contenido dentro de una matriz AST 12 en una estación 28 de dispensación inóculo-caldo.

Se pueden portar varias matrices AST 12 usando un portador 30 de matrices AST, que es transportado también por el sistema de transporte 16 a lo largo de la porción más trasera del analizador 10, entre la estación 28 de dispensación de inóculo-caldo, una estación 32 de carga de portadores de matrices, una estación 34 de llenado de matrices AST, una estación 36 de carga de matrices AST y una estación de elimina-

ción de matrices AST (no mostrada). Cuando se ha de cargar un portador 30 de matrices en la estación 32 de carga de portadores de matrices con matrices AST 12 sin ensayar, las matrices 12 se mueven hasta el portador 30 gracias a un mecanismo de alimentación (no mostrado) desde un carrusel 38 de almacenamiento de matrices AST, que contiene varias matrices AST 12 sin llenar. Después de que un portador 30 está cargado completamente con matrices AST 12 sin llenar, los portadores 30 de matrices son transportados hasta la estación 28 de dispensación de inóculo-caldo, en la que una cantidad de solución de inóculo-caldo se dispensa en un depósito receptor de solución de inóculo-caldo, descrito en lo que sigue, dentro de cada matriz AST 12 individual. Las matrices 12 son transportadas posteriormente hasta la estación 34 de llenado de matrices, en la que la solución de inóculo-caldo se dispersa uniformemente en todos los micropocillos de ensayo en las matrices 12 individuales, usando medios de vacío descritos en lo que sigue.

Se suministra caldo al analizador 10 en un recipiente apropiado, de manera que cuando se ha de llenar una matriz AST 12 de solución de inóculo-caldo, se introduce con la pipeta una cantidad conocida de inóculo, usando un sistema de pipetado 26 trasladable desde los tubos de ensayo 22 de muestras en un recipiente de caldo, se mezcla y luego se aspira desde el recipiente de caldo, entrando en el depósito 50 receptor antes mencionado de solución de inóculo-caldo de las matrices 12 de ensayo individuales.

Después de que varios micropocillos AST individuales, descritos en lo que sigue y formados dentro de las matrices 28 de ensayo AST, se cargan con solución de inóculo-caldo, las matrices AST 12 se incuban a temperaturas elevadas durante diferentes periodos de tiempo, dependiendo de las condiciones de ensayo, en el transcurso de los que se efectúan varias lecturas de ensayo. Las lecturas de ensayo se pueden obtener usando cualquier número de medios conocidos, incluyendo el uso de procedimientos ópticos en los que la luz, que se ha hecho pasar por un filtro interferencial, es guiada a través de la parte superior de los micropocillos AST de la matriz 12, usando lentes o canales de fibra óptica. Unos fotodiodos sensibles a la luz, o similares, detectan la cantidad de luz que pasa a través de cada micropocillo y generan una señal electrónica correspondiente al grado de turbidez dentro de cada uno. Los medios antimicrobianos están presentes en diferentes concentraciones especificadas en diferentes micropocillos de las matrices 12 de ensayo AST. La turbidez será menor, o no existente, en los pocillos en los que se ha inhibido el crecimiento gracias a los medios antimicrobianos. Así, la intensidad de la luz generada por una fuente de luz y capturada por un detector, después de la transmisión a través de cada micropocillo, es inversamente proporcional a la concentración de bacterias en ese pocillo. Alternativamente, usando un sistema de fluorímetro, la intensidad de la fluorescencia en cada micropocillo es proporcional a la concentración de bacterias en ese pocillo. Además, los micropocillos seleccionados pueden contener sustratos bioquímicos, que presentan un cambio de color o fluorescencia en presencia de ciertas bacterias. Una medición colorimétrica o fluorométrica produce información sobre la solución en el pocillo. La información óptica genera una señal eléctrica correspondiente, que se convierte entonces en forma digital compatible con un ordenador y se al-

macena en una memoria informática. La información digital es usada por una unidad central de procesamiento (CPU) 40, que tiene órdenes y circuitería de control, programados para controlar todos los aspectos de los dispositivos dentro del analizador 10. Después de que se ha analizado ópticamente una matriz 12 de ensayo y los valores se han almacenado, cada lectura del pocillo de ensayo se compara con un valor umbral correspondiente a un cierto porcentaje de absorbencia o fluorescencia relativa, que se encontró que correspondía a un crecimiento clínicamente significativo. Estas señales son procesadas entonces por la CPU 40, comparándolas con valores de control almacenados, calculando por ello el patrón AST. De este modo, se determina el MIC de cada medio antimicrobiano.

Como se ve en la realización de la presente invención ilustrada en la figura 2, que muestra una superficie de fondo inferior 11 plana de una matriz AST 12 (véase la figura 5B), y en la figura 3, que muestra una superficie superior 13 irregular de la matriz AST 12 descrita en lo que sigue (véase la figura 5B), cada matriz AST 12 tiene una longitud L a lo largo y una pluralidad de micropocillos 44 que sobresalen hacia arriba, formados en la superficie de fondo 11, como una fila lineal de micropocillos 44 únicos paralela a la longitud y tiene, por lo tanto, una forma rectangular generalmente alargada, con la superficie de fondo 11 y la superficie superior 13 en lados enfrentados, estando separadas las superficies opuestas por una pared lateral 15 con escotaduras (véase la figura 5B) y una segunda pared lateral 17 opuesta (véase la figura 5A). La matriz 12 incluye una pluralidad de micropocillos AST 44 que sobresalen hacia arriba, dispuestos en la superficie de fondo 11, por la longitud L a lo largo (figura 4) de la matriz 12, para formar una única fila lineal de micropocillos 44 individuales. Los micropocillos 44 individuales están interconectados por un único microcanal 42 al pocillo de evaporación 46 sacrificial, formado en la superficie de fondo 11 de la matriz de ensayo, sobresaliendo hacia arriba de una porción abierta de la superficie de fondo 11 y dispuesto entre la fila de micropocillos 44 y un depósito 50 descrito en lo que sigue. El pocillo de evaporación 46 se ve también en la figura 4, con una superficie superior 49 en forma de cúpula cerrada situada debajo de la superficie superior 13 de la matriz de ensayo, con un orificio 48 sellable de vacío formado en ella como una abertura en una superficie superior 49 en forma de cúpula del pocillo de evaporación 46 (figura 3, corte A-A). Los micropocillos 44 tienen la forma general de un pocillo cerrado que sobresale hacia arriba de la superficie de fondo 11 de la matriz 12, con una profundidad de aproximadamente tres cuartas partes del grosor de la matriz 12, como se ilustra en la vista en perspectiva de la figura 5A de la superficie superior 13 de la matriz 12, y tiene aberturas a lo largo de la superficie de fondo 11 de la matriz 12, como se ilustra en la vista en perspectiva de la figura 5B de la superficie de fondo 11 de la matriz 12.

Como se ve en la figura 2, el microcanal 42 está formado como una acanaladura abierta en la superficie de fondo 11 de la matriz 12 y conecta el pocillo de evaporación 46 a un depósito 50 receptor de solución de inóculo-caldo con forma rectangular, como se ve mejor en la figura 3, teniendo el depósito 50 una parte superior abierta y un fondo cerrado, ilustrado por líneas de trazos en la figura 2. Un extremo del

fondo del depósito 50 tiene una abertura 52 de flujo, ilustrada también por líneas de trazos en la figura 2, para permitir que una solución de inóculo-caldo sea dispensada en la parte superior del depósito 50, para que circule desde el mismo a través de un microcanal 41 corto, en primer lugar, al pocillo de evaporación 46 sacrificial y, luego, a través de un microcanal 42 más largo, secuencialmente a cada uno de la serie de micropocillos 44. Las porciones superficiales abiertas de los microcanales 41 y 42, la abertura 52 de flujo, el pocillo de evaporación 46 sacrificial y los micropocillos 44, a lo largo de la superficie de fondo de la matriz 12, pueden estar cerrados mediante un sellado por encima con una capa de cinta adhesiva (no mostrada), durante un procedimiento de fabricación, en el que los medios antimicrobianos de interés clínico se colocan en los diferentes micropocillos 44, pero no en el pocillo de evaporación 46 sacrificial. Opcionalmente, un pocillo se puede dejar vacío de medios antimicrobianos, de manera que se puede usar como referencia.

En una realización preferida de la presente invención, como se ilustra en la figura 3, que muestra la vista desde arriba de una matriz AST 12, tomada en unión con la figura 2, cada matriz AST 12 comprende una fila lineal singularizada de ocho micropocillos 44 individuales, conectados por el microcanal 42 lineal, que está formado en la superficie de fondo 11 de la matriz AST 12, como se ve mejor en la figura 2. El microcanal 42 está alineado paralelo a la fila de micropocillos 44 y está conectado a cada micropocillo 44 por un microcanal 43 corto. El microcanal 42 conecta además los micropocillos 44 al pocillo de evaporación 46 sacrificial, dispuesto entre un extremo de la fila de micropocillos 44 y el depósito 50 receptor de solución de inóculo-caldo.

El pocillo de evaporación 46 sacrificial se puede ver en la vista A-A en corte transversal de la figura 3, en la figura 3A y en la figura 2B (vista hacia arriba desde abajo), que comprende un par de paredes extremas 68 paralelas mutuamente opuestas conectadas por un par de paredes laterales 72 paralelas mutuamente opuestas. Las paredes extremas 68 son más cortas que las paredes laterales 72, y las paredes extremas 68 y las paredes laterales 72 son sustancialmente perpendiculares a la superficie de fondo 11 de la matriz 12 de ensayo. Las superficies superiores de las paredes extremas 68 y las paredes laterales 72 están conectadas por una superficie superior 49 cónica para formar una pequeña cámara de evaporación 70 generalmente rectangular, cerrada por el pocillo 46 sacrificial. Una propiedad importante del pocillo 46 sacrificial es el orificio 48 sellable de vacío formado como una abertura en la superficie superior 49 cónica, que permite que el aire sea evacuado del pocillo 46 sacrificial, sea evacuado de los microcanales 42 y 43 y sea evacuado de los micropocillos 44, durante una operación de llenado de inóculo-caldo descrita en lo que sigue. La cámara de evaporación 70 está dimensionada típicamente para alojar una cantidad de solución de inóculo-caldo en el intervalo de 0,02 a 0,04 ml.

El corte transversal B-B en la figura 3B ilustra los micropocillos 44 con una porción maciza de la superficie superior 54 irregular de la matriz 12, una porción 66 redondeada de pared extrema (véase también la figura 2A) de la pared lateral 17, una porción 64 plana de pared extrema (véase también la figura 2A) de la

pared lateral 15 con escotaduras y dos paredes laterales 62 paralelas. Ambas paredes extremas 66 y 64 están formadas sustancialmente perpendiculares a la superficie de fondo inferior 11 de la matriz 12 y están separadas por las dos paredes laterales 62 paralelas. La superficie superior irregular, la porción 64 plana de pared extrema y la porción 66 redondeada de pared extrema colaboran para definir una pequeña cámara 58 de ensayo AST. La superficie superior 54 irregular está configurada para formar una porción rebajada de borde superior de la cámara 58 de ensayo AST, adaptada para actuar como una trampa 60 de burbujas para las burbujas que se pueden generar a medida que la solución de inóculo-caldo se dispensa a través del microcanal 42 del depósito 50 a todos los micropocillos 44 de ensayo en una matriz 12. Se ha encontrado inesperadamente que cuando el micropocillo 44 está conformado como se describe en la presente memoria, entonces, si el microcanal 43 está situado a través sobre la superficie opuesta del micropocillo 44 desde la trampa 60 de burbujas, ésta es eficaz para capturar burbujas, cuando el micropocillo 44 está constituido por un material generalmente hidrófilo, como el estireno. Se ha observado que con tal disposición, a medida que la solución de inóculo-caldo entra en el micropocillo 44, algo del aire restante dentro del mismo es empujado por la solución expansora de inóculo-caldo, sin dejar ninguna cavidad de aire atrapado en el área central crítica superior de la cámara 58 de ensayo. Tal llenado se ilustra gráficamente en la figura 6. Así, se elimina aire lejos del área central de la superficie superior 54, a través de la que puede pasar un haz de radiación interrogante, como se describe en lo que sigue, sin requerir trampas de burbujas separadas de la cámara 58 o trampas de burbujas con complejas propiedades de válvula.

La cámara 58 de ensayo AST está dimensionada típicamente para alojar una cantidad de solución de inóculo-caldo en el intervalo de 0,03 a 0,04 ml. Como se ve también en la figura 2A, cada micropocillo 44 tiene una sección transversal lateral en forma generalmente alargada con dos paredes laterales 62 paralelas, la porción 64 generalmente plana de pared extrema perpendicular entre las paredes laterales 62 paralelas y la pared delantera 66 generalmente redondeada, también entre las dos paredes laterales 62 paralelas. En una realización preferida, la superficie superior 13 y la superficie de fondo inferior 11 tienen una anchura de aproximadamente 0,76-1,02 cm, la pared lateral 15 con escotaduras tiene un altura de aproximadamente 0,51-0,64 cm y la dimensión alargada de la matriz 12 de ensayo tiene una longitud de aproximadamente 6,35-7,62 cm. En tal realización, el microcanal 42 estaría dimensionado con una anchura y una profundidad de aproximadamente 0,03-0,05 cm.

El pocillo de evaporación 46 sacrificial está diseñado para conseguir dos fines importantes: en primer lugar, la provisión de una cámara de evaporación 70, de la que puede tener lugar la evaporación dedicada de las soluciones de inóculo-caldo, inhibiendo por ello la evaporación de solución de los micropocillos 44. Se inhibe la evaporación de los micropocillos 44, puesto que la evaporación debe ocurrir inicialmente de dentro del microcanal 53 y, luego, de la cámara de evaporación 70 dedicada, antes de que pudiera ocurrir evaporación de los microcanales 42 y 43 y de los micropocillos 44. La cámara de evaporación 70 propor-

ción además el orificio 48 sellable de vacío, a través del que se puede evacuar el aire contenido dentro de los micropocillos 44, de manera que el aire dentro de los mismos no burbujea por el caldo en el depósito 50 durante la evacuación y no genera burbujas de aire dentro de las soluciones de inóculo-caldo. Después de la evacuación, se sella posteriormente el orificio 48 sellable de vacío, a fin de generar una entrada de la solución de inóculo-caldo desde el depósito 50 en los micropocillos 44.

Para llenar los micropocillos 44 de una solución de inóculo-caldo a ensayar, el sistema de pipetado 26 dispensa una cantidad predeterminada de solución de inóculo-caldo en un depósito 50 para cada matriz de ensayo AST portada sobre un portador 30 de matrices AST en la estación 28 de dispensación de inóculo-caldo. Cuando todos los depósitos 50 se han cargado con solución de inóculo-caldo, el sistema de transporte 16 lleva en volandas el portador 30 de matrices AST a la estación 34 de llenado por vacío de matrices AST, en la que una cámara de vacío a modo de concha de almeja se baja sobre el portador 30 de matrices AST y se aplica vacío a todos los matrices 12 de ensayo AST portados sobre él. Cuando se aplica vacío alrededor de los matrices 12 de ensayo, se elimina aire de todos los micropocillos AST 44 a través del orificio 48 sellable de vacío, que está en comunicación de fluido con los micropocillos AST 44 individuales por medio de los microcanales 42 y 43. Con posterioridad a este procedimiento de evacuación, una fuente de calor, por ejemplo una barra previamente calentada con porciones presionadas o un hilo de resistencia eléctrica soportado dentro de la cámara de vacío, se puede poner en contacto con el orificio 48 de vacío y ser calentada por corriente eléctrica durante un tiempo predeterminado para sellar o cerrar el orificio 48 contra el flujo de aire, cuando se libera el vacío. Una vez que el orificio 48 está sellado, se libera el vacío dentro de la cámara de vacío. La presión atmosférica sobre la solución de inóculo-caldo en el depósito 50 hace que la misma entre a través de una abertura 52 en los microcanales 41, 42 y 43, llenando por ello el pocillo de evaporación 46 y en todos los micropocillos 44 en cada una de las matrices de ensayo AST portadas por el portador 30 de matrices AST. A medida que los micropocillos 44 se llenan de solución de

inóculo-caldo, todo el aire restante atrapado dentro de la cámara 58 entrará en la pequeña porción rebajada 60 de borde superior, que actúa como una trampa de burbujas dentro del micropocillo 44.

5 Preferiblemente, la matriz 12 de ensayo AST está construida de un material plástico moldeado, pero se pueden usar otros tipos de material. Más preferiblemente, el material usado en la construcción de la matriz 12 es generalmente translúcido, a fin de permitir la transmisión ininterrumpida de luz a través de los micropocillos 44 durante la prueba AST en el analizador 10 microbiológico. Como se ve en la figura 3, la matriz 12 incluye además un saliente 76 formado en la pared lateral 17, estando generalmente conformado el saliente 76 como un abultamiento que se extiende desde el cuerpo de la matriz 12 y formado en la porción más alta de la pared lateral 17. El saliente 76 se usa para facilitar la carga y retención de una matriz AST 12 dentro del portador 30 de matrices AST y, en una realización a modo de ejemplo, tiene dimensiones de aproximadamente 0,26-0,30 mm de prolongación hacia fuera del cuerpo de la matriz 12, de aproximadamente 3-4 mm de longitud a lo largo del borde de la matriz 12 y de aproximadamente 0,6-0,8 mm de profundidad a lo largo de la pared lateral 17 de la matriz 12. Alternativamente, el lado de la matriz 12 puede estar revestido con un material de alto rozamiento, tal como sílice o un polvo inerte, en lugar del saliente 76, para conseguir una función similar.

30 La prueba AST se puede conseguir convenientemente dirigiendo un haz de radiación interrogante desde arriba o abajo de cada matriz AST 12 a través de la porción central 56 de arco de la superficie superior 54 de cada micropocillo 44 y midiendo el grado de absorción o cambio de color o generación de una señal fluorescente, usando un fotodetector colorimétrico o fluorométrico situado debajo o encima de cada micropocillo 44. Por esta razón, la porción central superior 56 de la superficie superior 54 de cada micropocillo 44 (como se ve mejor en la figura 3) y la porción central inferior 57 de la superficie superior 54 de cada micropocillo 44 están moldeadas a fin de tener un acabado superficial uniforme equivalente a, o más uniforme que, un disco pulidor de diamante de calidad #3 de tipo SPI #A-1, a fin de minimizar la interferencia óptica durante la prueba AST.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de ensayo (12), adaptada para ensayar la susceptibilidad a los antibióticos de microorganismos, que comprende:

un cuerpo en forma alargada, con superficies superior y de fondo (11, 13) opuestas y paralelas, separadas por una pared lateral (17) generalmente plana y una pared lateral (15) opuesta generalmente con escotaduras, teniendo dicho cuerpo una longitud (L) y una pluralidad de micropocillos (44) que sobresalen hacia arriba, formados en la superficie inferior (11) como una fila lineal de micropocillos únicos paralela a dicha longitud;

un depósito abierto receptor de solución, formado en la superficie superior de la matriz de ensayo;

un pocillo de evaporación (46) sacrificial, formado en la superficie de fondo (11) de la matriz de ensayo (12), que sobresale hacia arriba de una porción abierta de la superficie de fondo (11) y dispuesto entre la fila de micropocillos (44) y el depósito (50), pocillo de evaporación (46) sacrificial que tiene una porción superior (49) cerrada próxima a la superficie superior de la matriz de ensayo, teniendo la porción superior un orificio (48) termosellable de purga de aire formado en ella;

un primer microcanal (42) abierto, formado en la superficie de fondo (11) del cuerpo alargado y que conecta cada micropocillo (44) al pocillo de evaporación (46) sacrificial; y

un segundo microcanal (41) abierto, formado en la superficie de fondo (11) del cuerpo alargado y que conecta el pocillo de evaporación (46) sacrificial al depósito (50) receptor de solución.

2. La matriz de ensayo de la reivindicación 1, que está formada por un material generalmente translúcido, y las porciones superior e inferior (56, 57) centrales de la superficie superior (54) de cada micropocillo (44) están moldeadas de manera se produce un acabado

superficial uniforme en dichas porciones centrales.

3. La matriz de ensayo de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un saliente de retención (76), formado en la pared lateral (17) generalmente plana, estando conformado generalmente el saliente como un abultamiento que se extiende hacia fuera de la matriz (12).

4. La matriz de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el número de micropocillos (44) que sobresalen hacia arriba es ocho, y cada micropocillo forma una cámara de ensayo dimensionada para alojar una cantidad de solución líquida en el intervalo de 0,5 a 0,9 ml.

5. La matriz de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el pocillo de evaporación (46) sacrificial está dimensionado para alojar una cantidad de solución líquida en el intervalo de 0,02 a 0,04 ml.

6. La matriz de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la superficie superior (11) y la superficie de fondo (13) tienen una anchura de 0,76-1,02 cm, las paredes laterales (17) opuestas tienen una altura de 0,51-0,64 cm y la matriz (12) tiene una longitud (L) total a lo largo de 6,35-7,62 cm.

7. La matriz de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el microcanal (41, 42) tiene una anchura y una profundidad aproximadas de 0,03-0,05 cm.

8. La matriz de ensayo de la reivindicación 2, en la que la uniformidad del acabado superficial es equivalente a, o más uniforme que, un disco pulidor de diamante de calidad #3 de tipo SPI #A-1.

9. La matriz de ensayo de la reivindicación 3, en la que el saliente de retención (76) tiene dimensiones de 0,26-0,30 mm de prolongación hacia fuera de la matriz (12), de 3-4 mm por la longitud del mismo y de 0,6-0,8 mm de profundidad a lo largo de la pared lateral (17) generalmente plana de la matriz (12).

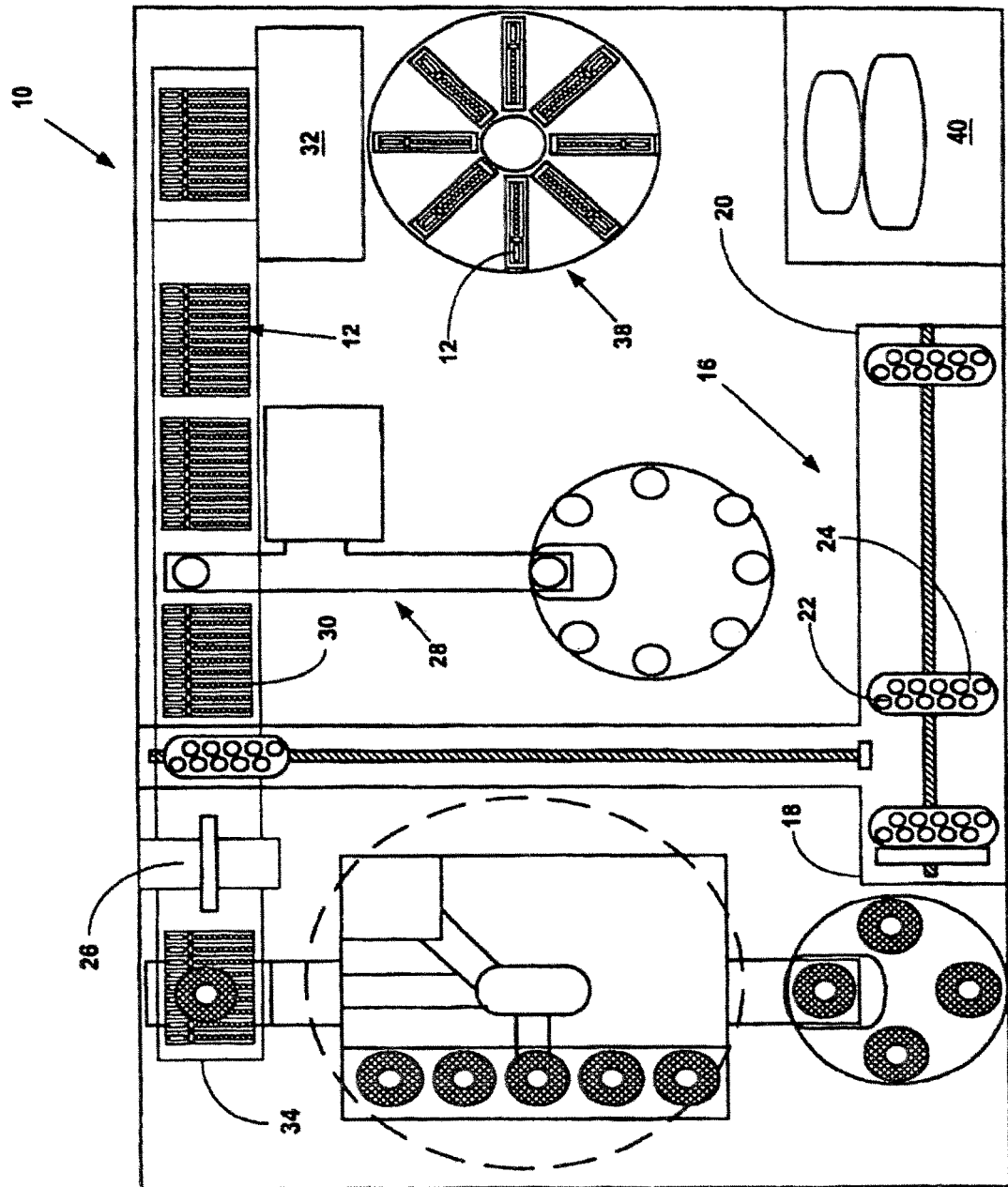


FIG. 1

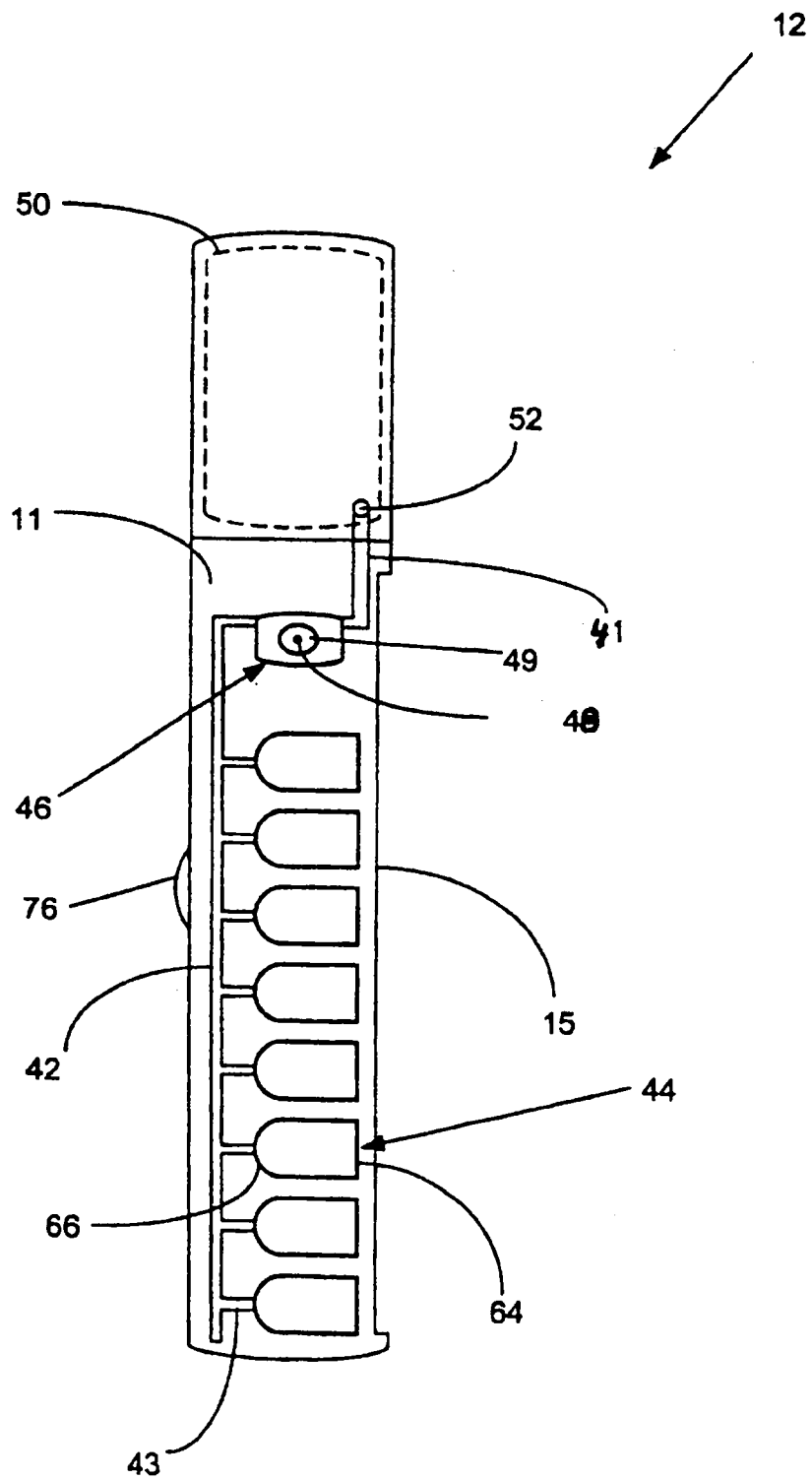


FIG. 2

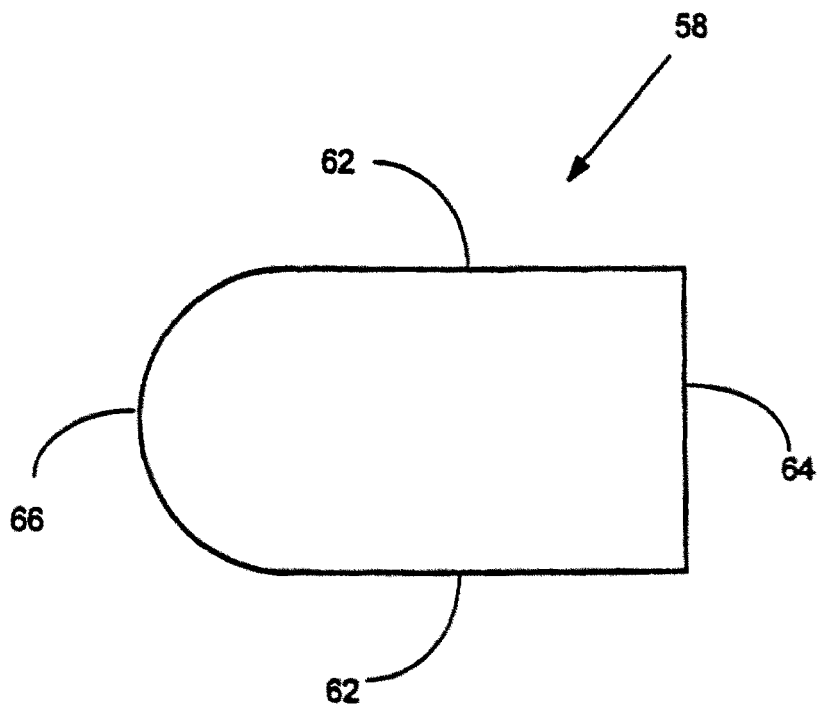


FIG. 2A

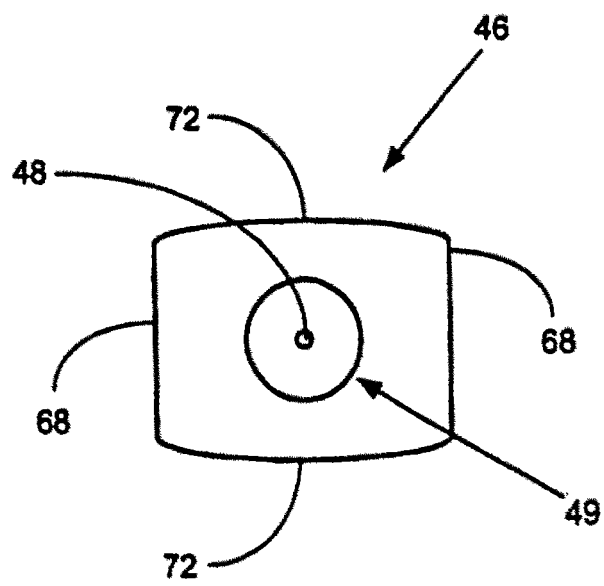


FIG. 2B

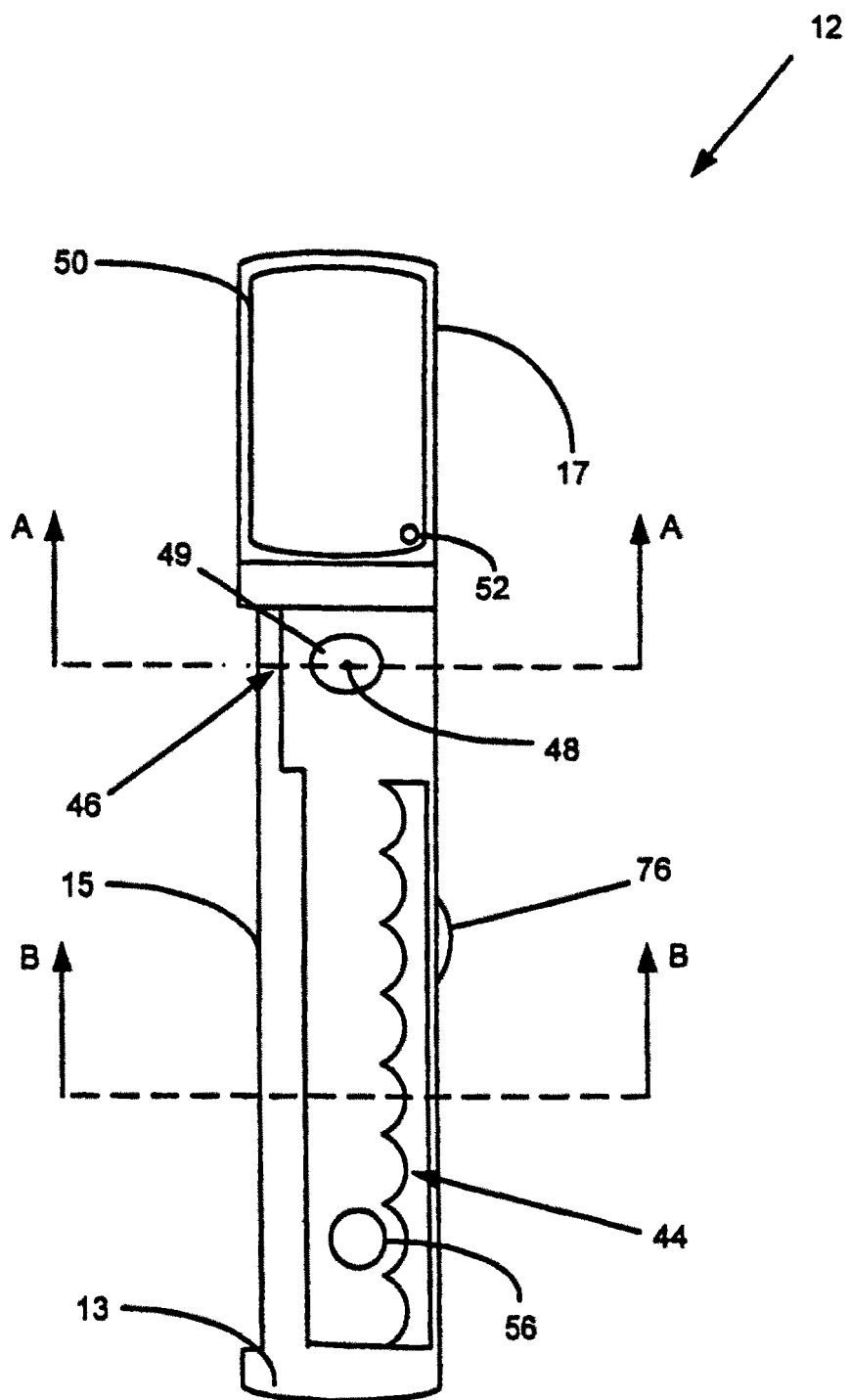


FIG. 3

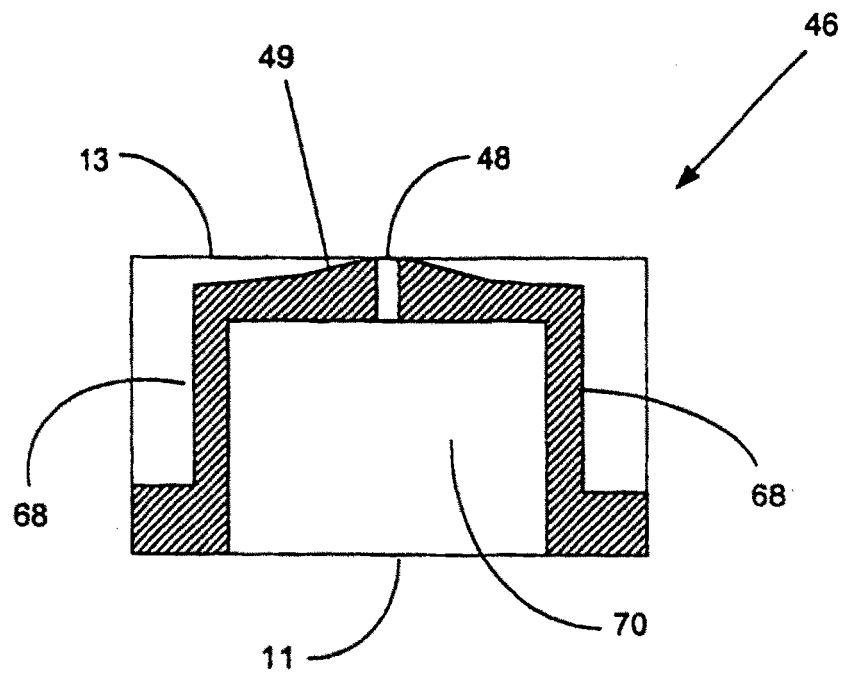


FIG. 3A

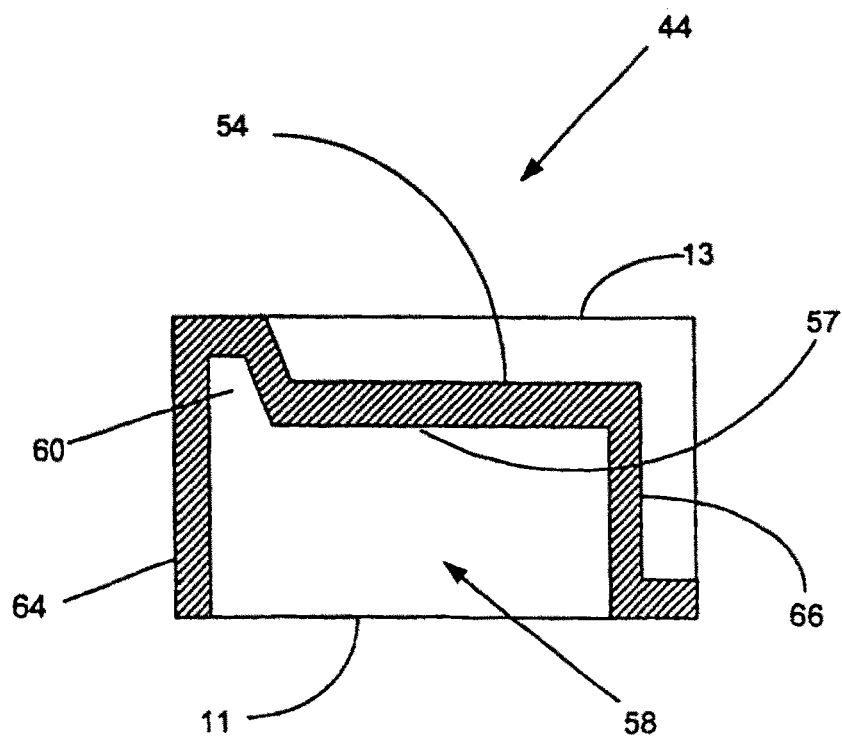


FIG. 3B

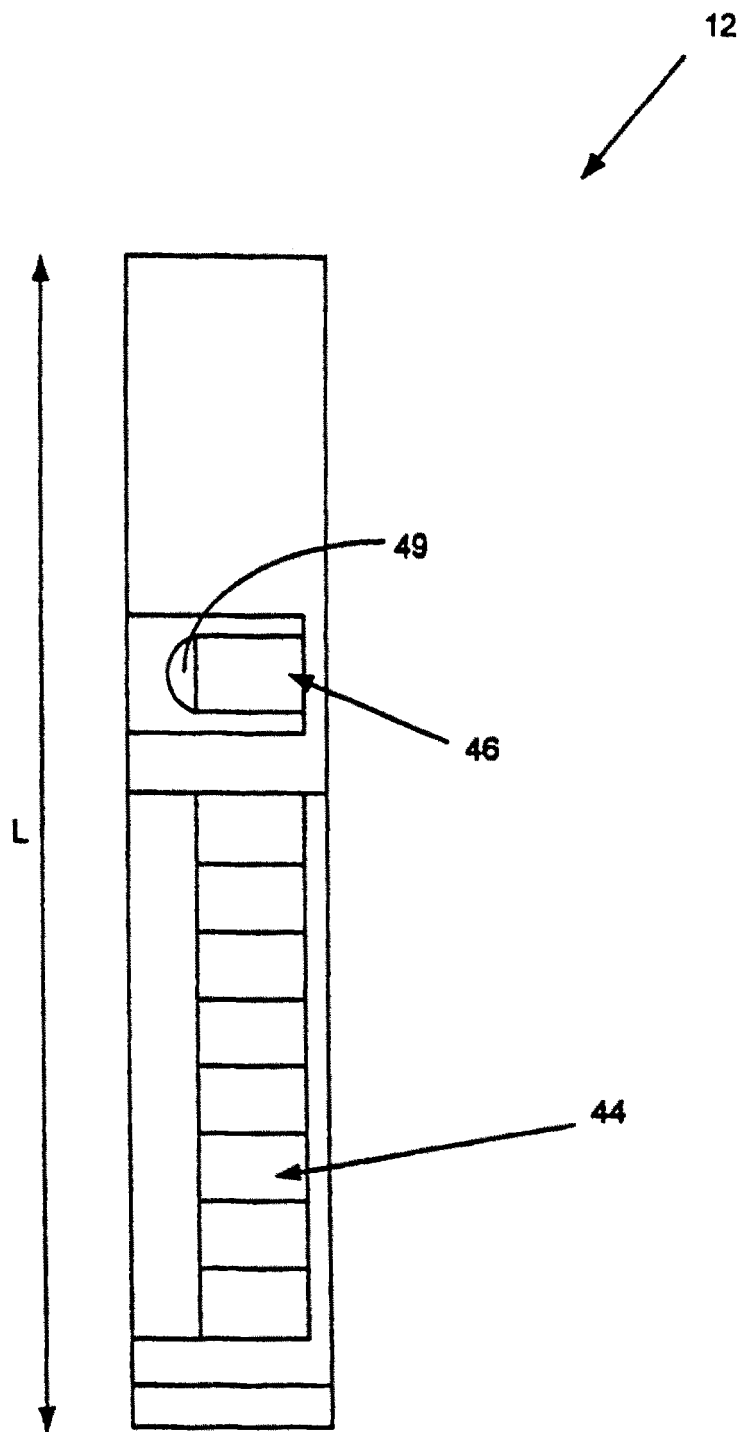


FIG. 4

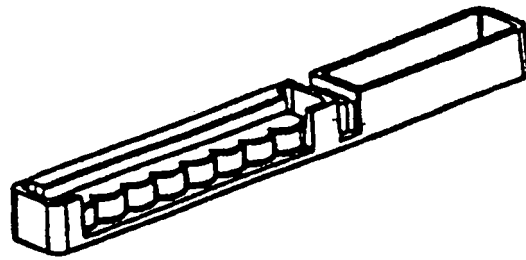


FIG. 5A

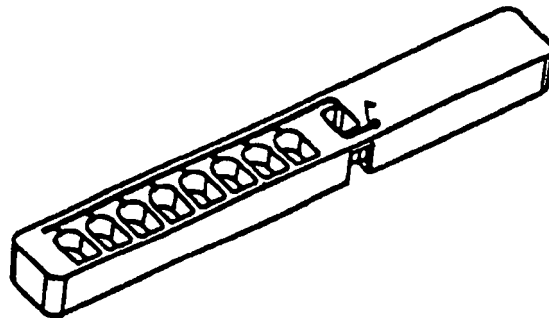


FIG. 5B

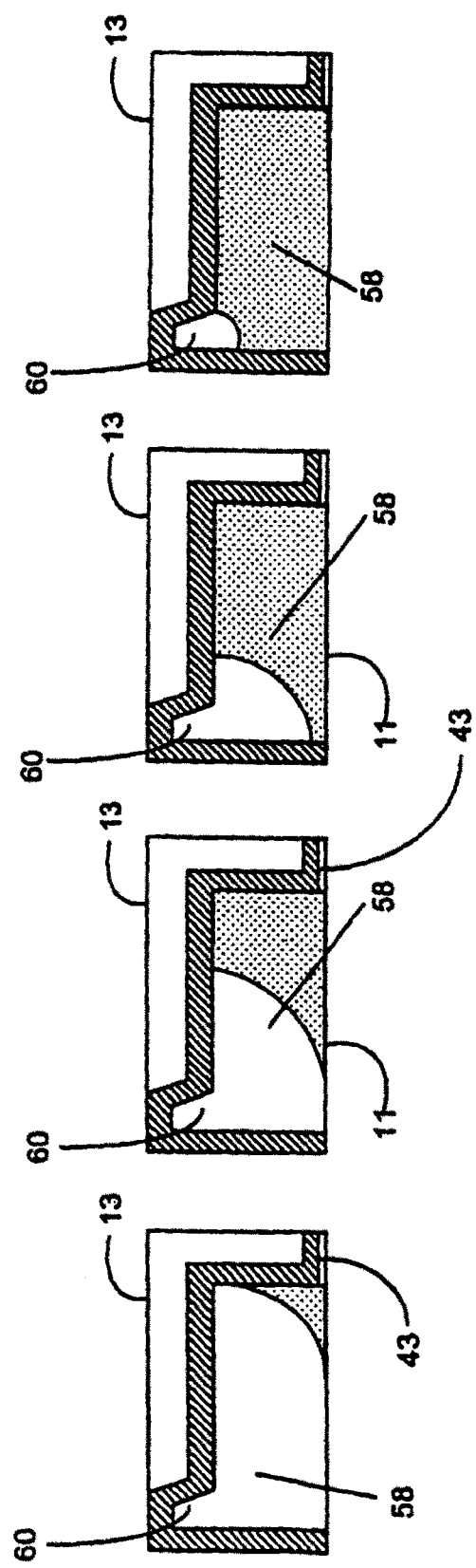


FIG. 6