



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 436**

51 Int. Cl.:  
**C12M 1/12** (2006.01)  
**C12M 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02725007 .5**  
96 Fecha de presentación : **27.02.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1395646**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **Dispositivo de filtración y detección integrado.**

30 Prioridad: **28.02.2001 US 272233 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.12.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2010**

73 Titular/es: **BIOMERIEUX, Inc.**  
**100 Rodolphe Street**  
**Durham, North Carolina 27712, US**

72 Inventor/es: **Engersen, Diederik;**  
**Diguseppi, James, L.;**  
**Jeffrey, Scott y**  
**Walsh, John**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 348 436 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).

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional americana de N° de Serie 60/272.233, presentada el 28 de Febrero de 2001.

5

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a dispositivos de detección y, más particularmente, a dispositivos para la detección del crecimiento microbiano en un espécimen.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Con frecuencia es deseable o es necesario ensayar muestras fluidas, tales como especímenes líquidos, para contaminación por microorganismos vivos. La presencia de contaminación microbiana en especímenes clínicos se determina convencionalmente cultivando los especímenes en presencia de nutrientes y detectando actividad microbiana a través de cambios en el espécimen o en la atmósfera sobre el espécimen después de un periodo de tiempo.

15

20

Con frecuencia es deseable ser capaz de ensayar un espécimen que tiene un volumen relativamente grande. Además, puede ser ventajoso aumentar la concentración de microorganismos en el espécimen sometiéndose a análisis de manera que los cambios en el espécimen o en la atmósfera adyacente se intensifiquen y así sean más fácilmente detectables y con mayor precisión.

25

30

El documento WO 98/11250 se refiere a un método y a un kit para la detección de microorganismos en una muestra tal como una masa, líquido o superficie que comprende colocar la muestra en contacto con una composición adaptada para detectar microorganismos. El método comprende obtener una muestra a partir de la masa, líquido o superficie y dentro de un recipiente colocar la muestra en contacto con

la composición presente en una cámara estéril en el recipiente. La cámara puede comprender un filtro el cual se usa para aislar y concentrar microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra. La detección de los  
5 microorganismos en la composición se alcanza mediante, por ejemplo, incubación de la composición bajo condiciones adecuadas para mantener el crecimiento de los microorganismos a detectar y seguido de la colocación de manera manual de la composición en un espectrofotómetro  
10 para registrar cualquier cambio de un indicador presente en la composición.

#### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente  
15 invención, un dispositivo de filtración y detección integrado para recoger y detectar el crecimiento de microorganismos en un espécimen incluye un recipiente que delimita una cámara dentro del mismo. El recipiente tiene una entrada y una salida en la comunicación fluida con la  
20 cámara. Un filtro está montado en la cámara entre la entrada y la salida. Un sensor está montado en la cámara. El sensor es operativo para mostrar un cambio en una propiedad medible del mismo tras la exposición a cambios en la cámara debido al crecimiento microbiano.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones del método de la presente invención, un método para recoger y detectar el crecimiento de microorganismos en un espécimen incluye proporcionar un dispositivo de filtración y detección integrado. El dispositivo de filtración y detección  
30 integrado incluye un recipiente que delimita una cámara en el mismo y que tiene una entrada y una salida en la comunicación fluida con la cámara. Un filtro está montado en la cámara ente la entrada y la salida. Un sensor está

montado en la cámara y es operativo para mostrar un cambio en la propiedad medible del mismo tras la exposición a cambios en la cámara debido al crecimiento microbiano. Se pasa el espécimen dentro de la cámara a través de la  
5 entrada, a través del filtro y fuera de la cámara a través de la salida para recoger los microorganismos sobre el filtro. Se detecta la propiedad medible del sensor.

Los objetivos de la presente invención serán apreciados por aquellos expertos en la técnica a partir de una lectura de las figuras y la descripción detallada de  
10 las realizaciones preferidas de a continuación, siendo dicha descripción meramente ilustrativa de la presente invención.

#### 15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Los dibujos adjuntos, los cuales están incorporados en la presente memoria y constituyen una parte de la memoria, ilustran las realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los  
20 principios de la invención.

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo de filtración y detección integrado de acuerdo con las realizaciones de la presente invención;

La Figura 2 es una vista transversal del dispositivo  
25 de la Figura 1 tomada a lo largo de la línea 2-2 de la Figura 1;

La Figura 3 es una vista en alzado lateral del dispositivo de la Figura 1, ilustrada con un suministro de espécimen asociado, un receptáculo de residuos asociado y  
30 una bomba asociada de acuerdo con las realizaciones de la presente invención;

La Figura 4 es una vista en alzado lateral del dispositivo, el receptáculo de residuos y la bomba de la

Figura 3, ilustrada con un suministro de fluido de lavado asociado de acuerdo con las realizaciones de la presente invención;

5 La Figura 5 es una vista en alzado lateral del dispositivo de la Figura 1, ilustrada con un suministro de medio de cultivo asociado de acuerdo con las realizaciones de la presente invención;

10 La Figura 6 es una vista en alzado lateral de un montaje de muestra que incluye el dispositivo de la Figura 1, junto con un tubo asociado y una abrazadera, donde el dispositivo contiene el medio de cultivo de acuerdo con las realizaciones de la presente invención;

15 La Figura 7 es una visión transversal, fragmentaria de un aparato de medición y el montaje de muestra de la Figura 6 montado en el mismo;

La Figura 8 es un diagrama en bloques que representa un método de recogida y detección del crecimiento de microorganismos en un espécimen de acuerdo con las realizaciones de la presente invención; y

20 La Figura 9 es una visión transversal de un dispositivo de filtración y detección integrado de acuerdo con más realizaciones de la presente invención.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION**

25 Ahora más adelante la presente invención se describirá más completamente en referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales se demuestran las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, esta invención se puede plasmar de muy diferentes formas y no se debería  
30 interpretar limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria; más bien, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta descripción será rigurosa y completa, y transmitirá completamente el alcance de la

invención para aquellos expertos en la técnica. Desde el principio hasta el final mismos números se refiere a los mismos elementos. En las figuras, las capas, los componentes o regiones se pueden exagerar para mayor claridad.

Los dispositivos y los métodos de la presente invención se pueden usar para detectar la presencia de microorganismos en especímenes clínicos, tales como sangre u otros fluidos corporales, y en especímenes no clínicos tales como comida, zumos, cosméticos, champús, productos farmacéuticos o de consumo, mediante el cultivo de los especímenes con un medio de crecimiento o de cultivo en un recipiente de un dispositivo de acuerdo con la invención. El espécimen se puede filtrar a través de un filtro dispuesto en el recipiente para capturar una muestra que incluya microorganismos del espécimen. La presencia y la identificación de los microorganismos se pueden determinar mediante, por ejemplo, detección o medición de cambios en el pH del espécimen o en la producción de CO<sub>2</sub> en el espécimen usando un sensor dispuesto en el recipiente. Así, los dispositivos y métodos pueden proporcionar un medio no invasivo para detectar la presencia de microorganismos en especímenes mediante la medición de un aumento en los subproductos metabólicos producidos por los microorganismos (directa o indirectamente). Además, el medio de cultivo y el filtro se pueden esterilizar y mantener estéril. Además, el recipiente se puede sellar eficazmente y mantener la integridad del sello durante el proceso de evaluación.

En referencia a las Figuras 1 y 2, se demuestra en las mismas un dispositivo de filtración y detección integrado de acuerdo con la presente invención y generalmente se designa en referencia al número 100. El dispositivo 100 se puede usar para filtrar una muestra de

microorganismos a partir de un volumen de un espécimen seleccionado para análisis y también para detectar el crecimiento de los microorganismos sin manipular directamente el filtro o exponer el filtro, el espécimen o la muestra a contaminación. Además, el dispositivo 100 está adaptado para un uso conveniente y eficaz con aparatos de medición electrónicos y automatizados reduciendo los costes de producción y el riesgo de contaminación inducida por proceso involuntario. El dispositivo 100 se puede sellar y esterilizar. Además, el dispositivo 100 puede ser desechable después de un único uso.

Volviendo a la construcción del dispositivo 100 en más detalle, el dispositivo 100 incluye un recipiente 110. El recipiente 110 puede estar formado de un material económico o no caro. Preferiblemente, el recipiente 110 está formado de un material que se puede esterilizar y sellar eficazmente usando medios convencionales. Más preferiblemente, el recipiente 110 está formado de policarbonato u otro plástico.

El recipiente delimita una cámara interior 112 y tiene un primero y segundo extremo opuesto 110A y 110B. Exteriormente un accesorio 115 se extiende entre los extremos 110A, 110B y delimita una entrada 116, la cual comunica de manera fluida con la cámara 112. Un accesorio 117 se extiende descendentemente desde el extremo 110A y delimita una salida 118, la cual comunica de manera fluida con la cámara 112. El recipiente 110 incluye una pared extrema 114 sobre el extremo 110B. Preferiblemente, al menos la pared extrema 114 del recipiente 110 es translúcida o transparente. Opcionalmente (no mostrado), el recipiente 110 se puede proporcionar además con un puerto de ventilación que comunica con la cámara 112.

Preferiblemente, la cámara 112 tiene un volumen de entre aproximadamente 10 mililitros y 1 litro.

Se asegura un sensor 120 a la pared extrema 114 de modo que una superficie 122 del sensor 120 (Figura 2) está en comunicación fluida con la cámara 112. El sensor 120 puede ser cualquier sensor adecuado para detectar o indicar un cambio en la cámara 112 causado por crecimiento microbiano. En el documento de Patente U.S. N° 5.856.175 de Thorpe *et al.* y en el documento de Patente U.S. N° 5.858.769 de DiGuisseppi *et al.* se describen sensores y métodos adecuados y materiales para la formación del mismo. Los siguientes sensores se pueden emplear de manera ventajosa, pero no son exhaustivos o exclusivos de los tipos de sensores que se pueden usar en la invención.

Tal como se discute a continuación, se puede añadir un medio de cultivo al espécimen. El medio de cultivo puede estar especialmente formulado para aumentar la producción de ciertos productos metabólicos microbianos. Estos productos metabólicos microbianos se pueden detectar mediante el sensor 120. El sensor 120 puede comprender una composición o membrana sólida (también referido más adelante en la presente memoria como un medio de unión o soporte), con un medio indicador inmovilizado sobre o dentro del mismo. Los sensores adecuados para usar como sensor 120, en diversas formas, incluyen: a) una suspensión de un medio indicador particular sólido inmovilizado dentro de un fluido inmiscible; b) una suspensión de un medio indicador particular sólido dentro de un polímero que a continuación se somete a curado; c) una suspensión de un medio indicador líquido impregnado o revestido sobre un soporte sólido e inmovilizado dentro de un fluido inmiscible; d) una suspensión de un medio indicador líquido impregnado o revestido sobre un soporte sólido e

inmovilizado dentro de un polímero que a continuación se somete a curado; e) una emulsión de un medio indicador líquido en un fluido inmiscible; f) una emulsión de un medio indicador líquido en un polímero que a continuación  
5 se somete a curado; y g) una membrana y un medio indicador, siendo el medio indicador seleccionado por su capacidad de mostrar un cambio detectable cuando se expone a subproductos de la actividad metabólica de un organismo.

El sensor 120 preferiblemente se localiza alineado  
10 frente a la superficie interior del recipiente 110. Preferiblemente, la pared extrema 114 es transparente o translúcida de modo que el medio indicador es visible desde fuera. El sensor 120 se puede fijar al recipiente 110 para prevenir que se cojan células, proteínas, otros sólidos u  
15 otros componentes opacos o coloreados entre él y la superficie del recipiente. En ciertas realizaciones, el sensor 120 se separa del espécimen y su medio de crecimiento mediante una membrana, una capa viscosa o una capa sólida que permita el paso de moléculas de gas pero  
20 prevenga el paso de iones.

Los componentes nutricionales que componen un medio microbiano complejo influyen las rutas metabólicas usadas por los microorganismos. Ácidos orgánicos, bases y diversos gases se producen en proporciones dependientes de los  
25 nutrientes disponibles. Estos productos también varían de especie en especie de microorganismo. La presencia de estos productos en el medio líquido puede cambiar su pH. El sensor 120 usado en la invención puede contener indicadores sensibles al pH que dan un cambio medible en respuesta a un  
30 cambio de pH en el ambiente. En el ambiente en el que el sensor de pH se cubre por una membrana impermeable a iones y permeable a gas, se puede medir la presencia de gases que afectan al pH del indicador, tales como CO<sub>2</sub> o amoníaco.

Así, se puede detectar el crecimiento microbiano o bien mediante los cambios en el pH del medio de cultivo líquido o mediante la medición de gases disueltos en el medio, siendo ambas indicaciones causadas por productos gaseosos metabólicos producidos por los microorganismos. El dióxido de carbono es un metabolito universal producido por todos los organismos y, por lo tanto, es el metabolito preferido para la detección del crecimiento microbiano.

Los sensores de pH y CO<sub>2</sub> tal como se usa por el sensor 120 pueden compartir dos componentes comunes, una especie molecular útil como indicador de pH y un medio de unión/soporte. El indicador de pH se puede unir o bien de manera covalente o de manera no covalente al medio de soporte. Alternativamente, el indicador se puede encapsular dentro de una matriz de polímero tal como una disolución indicadora que se emulsiona dentro de una matriz de polímero antes de someterse a curado, o partículas de indicador sólido que se colocan en suspensión dentro de una matriz de polímero, la cual a continuación se somete a curado.

Además, el indicador se puede unir al medio de soporte sólido, por ejemplo, empapando o impregnando el medio de soporte con una disolución indicadora y, a continuación, secándola. El medio de soporte puede ser una membrana tal como una membrana de nylon. A continuación, el medio de soporte impregnado y secado se puede reducir a un polvo fino, si es necesario, y mezclar con un fluido inmiscible, tal como un polímero o un fluido viscoso, formando un sensor de suspensión. En ciertas realizaciones, el polímero se puede someter a curado. En otras realizaciones se puede fabricar un sensor de suspensión combinando un indicador sólido en forma tipo granular o partícula con un fluido inmiscible, de nuevo, tal como

polímero y, a continuación, sometiendo a curado si es necesario.

Para funcionar como sensor de CO<sub>2</sub>, el sensor 120 debe ser capaz de reaccionar con los subproductos de los microorganismos. El sensor de CO<sub>2</sub> tiene un tercer componente, una sustancia semipermeable que separa completamente la membrana indicadora del espécimen y del medio de crecimiento. La capa semipermeable puede ser una membrana separada, alternativamente, el polímero curado adyacente al espécimen y al medio de crecimiento pueden formar una membrana integral semipermeable. Estos sensores se pueden fijar al recipiente 110 con un adhesivo apropiado o como indicador emulsificado dentro de una matriz de polímero curado *in situ*.

Se pueden usar una diversidad de diferentes indicadores fluorescentes y visibles de pH como especies moleculares activas en sensores de pH o de CO<sub>2</sub>. Deberían tener rangos de pH dinámicos aceptables y cambios de longitud de onda que sean fácilmente detectables por tecnologías de fluorescencia o reflectancia de superficie frontal.

Preferiblemente, los sensores para detectar cambios de pH en el medio de cultivo de acuerdo con la invención muestran un cambio en propiedades medibles tales como intensidad de fluorescencia o color visible al menos sobre un rango de pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 8.0. Preferiblemente, los indicadores para los sensores de CO<sub>2</sub> muestran un cambio en propiedades medibles tales como la intensidad de fluorescencia o color visible al menos entre aproximadamente pH 13 y aproximadamente 5, y más preferiblemente entre aproximadamente pH 13 y aproximadamente 9, para detectar cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>.

Preferiblemente, los indicadores de pH pertenecen a los grupos de los xanteno, fenolftaleína y fenolsulfonftaleína. Ejemplos de estos incluyen: fluoresceína, coumarina, fenolftaleína, timolftaleína, azul de bromotimol, azul de timol, azul de xylenol y  $\alpha$ -naftol benzeína.

El medio de unión/soporte puede ser una sustancia tal como celulosa, a la cual se puede unir de manera covalente un indicador de pH usando reacciones orgánicas. La unión no-covalente de los indicadores de pH se puede alcanzar usando materiales de soporte iónicos, tales como membranas de nylon que tienen un potencial zeta positivo o negativo. Otros materiales de soporte iónico que se pueden usar son resinas iónicas cargadas positiva o negativamente, tal como resina de dietilamino etilo (DEAE) o celulosa de DEAE. Se puede requerir el pretratamiento del material de soporte con una proteína si la membrana indicadora es para estar en contacto directo con el medio de crecimiento microbiano.

Los sensores indicadores de pH detectan directamente los cambios de pH debido al ambiente de pH del medio de crecimiento microbiano. Sin embargo, estos sensores 120 se pueden producir para reaccionar selectivamente con gases (por ejemplo, dióxido de carbono, amoníaco) en el medio de crecimiento líquido al revestirlos con una membrana o composición selectivamente semipermeable, tal como silicona, látex, teflón o diversos plásticos caracterizados por la capacidad de permitir selectivamente la difusión de un gas mientras previene el paso de los iones. Para los sensores 120 que comprenden indicador encapsulado dentro de una matriz de polímero, tales como sensores de emulsión o suspensión, el polímero que forma la matriz puede actuar como barrera semipermeable que permite el paso de gases pero no de iones.

En las realizaciones del sensor de emulsión del indicador encapsulado, el sensor de CO<sub>2</sub> preferiblemente está comprendido por cuatro componentes. El primer componente es un indicador de pH visual o fluorescente, el cual preferiblemente es reactivo al menos al intervalo de pH entre 6 y 10. Ejemplos de indicadores que encuentran estos criterios son azul de bromotimol, azul de timol, azul de xilenol, fenolftaleína, coumarina y fluoresceína. El segundo componente es hidróxido de sodio o una base equivalente, el cual mantiene un ambiente de pH óptimo para la detección de CO<sub>2</sub> mediante el indicador de pH seleccionado. El tercer componente es glicerol o un emulsionante equivalente, el cual puede producir gotitas de disolución indicadora emulsificada dentro del polímero no curado. El cuarto componente es el polímero no curado tal como silicona, la cual mantiene un ambiente apropiado para el indicador. Se puede usar cualquier polímero que no afecte a la actividad química del indicador, o bien a partir de sus propiedades químicas o físicas o sus requerimientos para el curado, siempre que sea permeable a gases pero no a iones, y no tenga estas propiedades alteradas cuando se somete a esterilización. Otros polímeros de silicona que también son satisfactorios son aquellos que son curados a alta temperatura, mediante actividad catalítica o mediante vulcanización ultravioleta. Se prepara una emulsión a partir de los cuatro componentes y el polímero se somete a curado para formar una matriz semipermeable alrededor de las gotitas del indicador de pH, lo cual permite la difusión selectiva de CO<sub>2</sub> y otros gases desde el medio de crecimiento microbiano líquido, dando como resultado un cambio medible en el indicador. El sensor se puede preparar de forma separada, tal como en un molde, someter a curado y a continuación unir al recipiente 110

con un adhesivo apropiado, tal como un adhesivo de silicona. Alternativamente, y preferiblemente, el sensor 120 está formado sobre la pared extrema 114 del recipiente 110 y se somete a curado *in situ*.

5           Igualmente, el sensor de CO<sub>2</sub> se puede fabricar como una suspensión, incorporando muchos de los mismos elementos anteriormente mencionados. Generalmente, una suspensión se define como un sistema en el cual muchas partículas pequeñas están más o menos uniformemente dispersas en un  
10 medio líquido. Si las partículas son lo suficientemente pequeñas para pasar a través de las membranas filtro, el sistema es una suspensión coloidal. Si las partículas son más grandes que las dimensiones coloidales tienden a precipitar, si son más pesadas que el medio de suspensión,  
15 y a aglomerarse y ascender a la superficie, si son más ligeras. (Hawley's Condensed Chemical Dictionary, editado por N. Sax and R. Lewis, Sr., 11<sup>a</sup> edición, 1987, N.Y., N.Y.)

Se puede combinar o mezclar un tipo granular o en  
20 partícula de medio indicador con un fluido inmiscible adecuado, de modo que el resultado es una suspensión del medio indicador sólido en el fluido. Si se usa un polímero como fluido, se puede someter a curado después de formar la suspensión para producir un sensor de suspensión sólido.

25           Al añadir un medio de soporte a una disolución indicadora, se puede producir otro tipo de sensor en suspensión. En este ambiente, el medio indicador es un sólido, tal como un medio indicador soluble adecuado disuelto en una disolución de NaOH, el cual se une a un  
30 medio de soporte sólido, por ejemplo, mediante impregnación o revestimiento del medio de soporte sólido. A continuación, se seca el medio de soporte sólido indicador, y se puede reducir hasta un polvo fino, por ejemplo por

corte o molienda, o usarlo tal como es. El soporte impregnado o revestido se combina con un líquido inmiscible, tal como un polímero, tal como anteriormente, formando una suspensión. El sensor en suspensión se puede  
5 usar del mismo modo que el anterior sensor en emulsión. Tal como con el sensor en emulsión, cuando el sensor en suspensión implica el uso de un polímero que puede necesitar ser curado, es preferible formar el sensor en suspensión directamente en el recipiente 110 y a  
10 continuación se somete a curado *in situ*. Si así se desea, se puede colocar un material semipermeable sobre el sensor en suspensión para separar el sensor de los contenidos líquidos o sólidos del recipiente. Por ejemplo, se puede colocar sobre el sensor en suspensión una cobertura (no  
15 mostrada) de un polímero semipermeable o un líquido inmiscible. Preferiblemente, la cobertura refleja luz que pasa a través del sensor 120 y también protege el sensor 120 del contacto directo con los contenidos líquidos o sólidos del recipiente.

20 Se puede formar un sensor 120 ejemplar de azul de xilenol, NaOH, tampón de borato y Triton X-100.

Como alternativa adicional, el sensor 120 puede ser un sensor fluorescente sensible a  $O_2$ . Al crecer los microbios en la cámara 112, consumen  $O_2$  reduciendo así la  
25 cantidad de  $O_2$  en el sensor 120. La fluorescencia del sensor, la cual se apaga con  $O_2$ , aumenta al disminuir la concentración de  $O_2$ . Así el crecimiento microbiano se puede detectar mediante el aumento en la fluorescencia. Por ejemplo, el sensor 120 puede ser un sensor como el descrito  
30 en el documento de Patente U.S. N° 5.998.517 de Gentle *et al.* y el documento de Patente U.S. N° 5.567.598 de Stitt *et al.*

Otro tipo de sensor que se puede usar para el sensor 120 incluye un aparato piezoeléctrico (no mostrado), tal como una tira piezoeléctrica, que se une al recipiente 110. La señal desde el aparato piezoeléctrico se puede poner automáticamente a cero cuando el recipiente 110 y sus contenidos alcanzan una temperatura dada o seleccionada (por ejemplo, una temperatura de incubación). El aparato piezoeléctrico se puede construir y/o montar de modo que se deforme por la presión de los productos metabólicos producidos por los microorganismos. Las señales eléctricas generadas a partir de la distorsión se pueden medir para hacer un seguimiento de la actividad biológica dentro del recipiente 110.

De nuevo en referencia a las Figuras 1 y 2, se monta un filtro de recogida 130 adyacente al extremo 110A del recipiente 100 y entre la entrada 116 y la salida 118. En ciertas realizaciones, se construye el filtro 130 y se monta de modo que básicamente todo el paso de fluido desde la entrada 116 a la salida 118 pasa a través del filtro 130. Tal como se muestra, el filtro 130 se adapta para recoger todo o una porción sustancial de los microorganismos potenciales o anticipados de un espécimen mientras que permite pasar el fluido vehículo del espécimen a través del filtro 130. En la Figura 1, el filtro se extiende a través de todo el área transversal de la cámara. Preferiblemente, el filtro 130 es un filtro microporoso configurado para capturar microorganismos en el mismo mientras que pasan componentes solubles del espécimen, fluido de lavado o medio de cultivo. El filtro microporoso puede ser hidrofóbico o hidrofílico. Preferiblemente, los poros del filtro microporoso no son más grandes de 0,4 micras, y, más preferiblemente, están entre aproximadamente 0,2 y 0,4 micras. Membranas de filtro adecuadas para el

filtro 130 incluyen: producto n° GSWP 0500 (hidrofílico, basado en celulosa, para disoluciones acuosas) y producto n° FGCP 04700 (hidrofóbico, basado en Teflon™, para disoluciones disolventes), cada uno disponible en Milipore Corporation of Bedford, Massachusetts.

En referencia a las Figuras 3-7 y al diagrama de flujo de la Figura 8, el dispositivo 100 se puede usar de la siguiente manera para filtrar y detectar el crecimiento de los microorganismos de un espécimen. Inicialmente, el dispositivo 100 (que incluye el filtro 130 y el sensor 120) así como el tubo 142, 152, 162 y 172 descritos a continuación se puede esterilizar, por ejemplo, usando un autoclave, desinfectante químico o radiación. Tal como se muestra en la Figura 3, se conecta un suministro 140 del espécimen fluido (generalmente líquido) al accesorio 115 del dispositivo 100 mediante el tubo 142 adecuado. El espécimen puede ser, por ejemplo pero no limitado a, agua potable, bebidas o productos alimenticios, compuestos farmacéuticos y sus intermedios de producción, o fluidos parenterales.

En otra referencia a la Figura 3, se conecta un receptor de residuos 150 al accesorio 117 mediante el tubo 152 adecuado. El receptor de residuos 150 está conectado de manera operativa de uno en uno a una fuente de flujo de fluido tal como una fuente de vacío 154 que puede ser una bomba. Alternativamente, se puede proporcionar una bomba (por ejemplo, una bomba peristáltica) en el tubo 142. También se pueden usar otras fuentes de flujo. Por ejemplo, el espécimen puede ser administrado por gravedad. Se maneja la fuente de vacío 154 para crear un vacío en la entrada 116 (Figura 2) del dispositivo 100. Así se atrae el espécimen, secuencialmente, desde el suministro 140, a través del tubo 142, a través de la entrada 116, a través

del filtro 130, a través de la salida 118 (Figura 2), a través del tubo 152 y dentro del receptor de residuos 150 (Bloque 192 de la Figura 8). Al pasar el espécimen a través del filtro 130, se recogen sobre el filtro 130 los  
5 microorganismos (si están presentes) en el espécimen, se capturan o atrapan (es decir, se inhiben o se previenen) al pasar con el resto del espécimen al receptáculo de residuos 150. Estos microorganismos capturados constituyen una muestra que se puede usar para evaluar la presencia de  
10 microbios en el suministro de espécimen 140. De manera ventajosa, la concentración de microorganismos en la muestra se puede aumentar básicamente en comparación con la concentración de los microorganismos en el espécimen de manera que los cambios causados por el crecimiento de  
15 microbio se detectan pronto y así más eficazmente. Preferiblemente, básicamente todo el espécimen no capturado en el filtro 130 se extrae de la cámara 112. Generalmente, el volumen del espécimen filtrado puede estar en el intervalo de entre aproximadamente 100 mililitros y 10  
20 litros.

En referencia a la Figura 4, se puede dirigir una etapa de lavado opcional. Más particularmente, se puede conectar un suministro de fluido de lavado 160 al accesorio 115 mediante el tubo 115 adecuado (preferiblemente  
25 estéril). El fluido de lavado se extrae o se dirige secuencialmente a través de la entrada 116, el filtro 130 y la salida 118 y dentro del receptáculo de lavado 150 mediante la fuente de vacío 154 (Bloque 193). Se puede usar la etapa de lavado, por ejemplo, para lavar conservantes u  
30 otros inhibidores del crecimiento microbiano desde el recipiente 110, el filtro 130 y la muestra capturada. Los fluidos de lavado adecuados pueden incluir, por ejemplo, medios de crecimiento, disoluciones salinas tamponadas,

detergentes o emulsionantes y se esterilizan antes de introducirlos en la cámara 112.

A continuación, y preferiblemente después de que se drene el fluido de lavado de la cámara 112 (no mostrado en las Figuras 3-5), se conecta un suministro 170 de medio o caldo de cultivo al accesorio 115 mediante el tubo adecuado 172 (Figura 5). Preferiblemente, el tubo 172 y el medio de cultivo están estériles. Preferiblemente, el dispositivo 100 está invertido tal como se muestra en la Figura 5. A continuación, el medio de cultivo se administra, por ejemplo, por administración por gravedad, desde el suministro 170, a través del tubo 172, a través de la entrada 116 (Figura 2) y dentro de la cámara 112 (Bloque 194 de la Figura 8). La salida 118 (Figura 2) sirve como ventilación para el aire en la cámara 112 desplazado por el medio de cultivo. El medio de cultivo preferiblemente se esteriliza antes de la introducción a la cámara 112. Se puede usar una válvula unidireccional para inhibir la entrada de fluidos o aire tal como sea necesario (no mostrado).

En referencia a la Figura 6, se puede colocar una tapa 175 (preferiblemente una tapa a rosca) sobre el accesorio 117. Se fija una abrazadera 174 adecuada sobre el tubo 172. A continuación, se corta el tubo 172 sobre la abrazadera 174 de modo que una porción 172A del tubo 172 permanezca unida al accesorio 115. De esta manera, el tubo 172A y la abrazadera 174 forman un cierre seguro y estéril a la entrada 116. El dispositivo 100, el tubo 172A, la abrazadera 174, el medio de cultivo contenido 171 y la muestra de microorganismo capturada forman juntos un montaje de muestra 101 (Figura 6). También se pueden usar otras técnicas de cierre o sellado tales como adhesivos, calor para cerrar el tubo, bridas para cables y similares.

A continuación, se puede colocar el montaje de muestra 101, o una pluralidad de montajes de muestra 101, en un aparato de medición adecuado 180 (Bloque 195 de la Figura 8). El aparato de medición puede ser un aparato automatizado tal como se describe en el documento de Patente U.S. N° 5.858.769 de DiGuisseppi *et al.* o tal como se describe en el documento de Patente U.S. N° 5.164.796 de DiGuisseppi *et al.* El montaje de muestra 101 se puede insertar en una ranura 184 en una plataforma 182 para la evaluación mediante un montaje detector (normalmente designado 181). El montaje detector 181 incluye un foto-emisor 186 y un fotodetector 188, cada uno de los cuales están conectados de manera operativa a un aparato de análisis 189. El foto-emisor 186 dirige la luz hacia el sensor 120 y la luz se refleja de vuelta al fotodetector 188. El aparato de análisis 189 evalúa las señales del fotodetector, por ejemplo, de la manera descrita en el documento de Patente U.S. N° 5.164.796. Los resultados del análisis de microorganismo se pueden automatizar y generar resultados sin requerimiento de evaluación humana.

De la manera ya conocida, el aparato de medición 180 detecta cambios en el sensor 120 y así mide el crecimiento microbiano en la cámara 112 (Bloque 196). Por ejemplo, el aparato de medición 180 puede detectar cambios en el color o en la fluorescencia del sensor a través de la pared extrema transparente 114, estando dichos cambios de color o fluorescencia causados por cambios de pH, la generación de CO<sub>2</sub> y/o el consumo de O<sub>2</sub> en la cámara 112 a partir del crecimiento microbiano. Por ejemplo, el aparato de medición 180 puede incluir instrumentos tal como se describen en la solicitud de Patente americana de N° de serie 07/322.874, presentada el 3 de Abril de 1989 (actualmente abandonada), y 07/351.476, presentada el 15 de Mayo de 1989 (actualmente

abandonada), el documento de Patente U.S. N° 4.945.060 y el documento de Patente U.S. N° 5.856.175. El aparato 180 puede incluir un reflectómetro de luz visible que hace un seguimiento del cambio de color del sensor. Se pueden usar detectores e iluminadores de estado sólido. También se pueden usar fuentes de iluminación de lámpara de arco e incandescentes junto con espejos, lentes, fibras ópticas y otros medios de dirigir la luz al sensor. Para permitir el seguimiento continuo de todas las muestras, es preferible tener un detector para cada muestra. Las salidas de los diversos detectores pueden ser compiladas por un ordenador y se pueden generar curvas características de la cantidad e índice de cambio de pH o concentración de CO<sub>2</sub> u O<sub>2</sub> de diversas muestras. El ordenador también puede realizar el análisis necesario para evaluar las características desarrolladas y para determinar la presencia o ausencia del desarrollo de los cultivos microbianos. El aparato 180 y/o aparatos adicionales pueden calentar y/o agitar el dispositivo 100 para incubar o sino promover el crecimiento de los microorganismos de la muestra.

En referencia a la Figura 9, se muestra en la misma un dispositivo de filtración y detección integrado 200 de acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención. El dispositivo 200 incluye un cuerpo de recipiente 210 que delimita una cámara interior 212. El cuerpo de recipiente 210 tiene una pared extrema 214 y delimita una abertura 212A que comunica con la cámara 212. Preferiblemente, la pared extrema 214 es transparente.

Se deposita una tapa extrema 219 sobre la abertura 212A. Se puede usar un anillo en O ("O-ring") 211, una junta, adhesivo u otro sellante para proporcionar un sello entre la tapa 219 y el cuerpo del recipiente 210. Un segundo accesorio 215 se extiende a través de la tapa 219 y

delimita una entrada 216. Un segundo accesorio 217 se extiende a través de la tapa 219 y delimita una salida 218.

Se asegura un filtro de flujo radial 230 a la superficie inferior de la tapa 219. Preferiblemente, el  
5 filtro 230 es un filtro microporoso. El filtro 230 preferiblemente está construido y montado de modo que básicamente todo fluido que pasa desde la entrada 216 a la salida 218 pasa a través del medio filtro del filtro 230. Se puede colocar un segundo filtro 232 entre el filtro 230  
10 y la salida 218. Preferiblemente, el segundo filtro 232 también es un filtro microporoso.

Se puede asegurar un sensor 220 a la pared extrema 214 (u otra localización deseada externamente visible). El sensor 220 puede ser cualquiera de los sensores y se puede  
15 montar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente respecto al sensor 120.

El depósito 200 se puede usar básicamente de la misma manera que el dispositivo 100 con conexiones que se hacen con los accesorios 215 y 217 en lugar de los accesorios 115  
20 y 117, respectivamente. Puede ser deseable invertir el dispositivo 100 durante las etapas de filtración del espécimen e introducción del fluido de lavado. Se puede cortar el tubo 272 que corresponde al tubo 172 y unir con abrazadera o asegurar de la misma manera descrita  
25 anteriormente para proporcionar un cierre seguro y estéril. El filtro 232 sirve para prevenir o inhibir la entrada de contaminantes dentro de la cámara 212 a través de la salida 218. Además, se puede colocar una tapa sobre el accesorio 215 y/o el accesorio 217. También, se puede proporcionar  
30 ninguno o ambos de los accesorios 215, 217 con una válvula unidireccional.

Como alternativa adicional, se puede asegurar el sensor 220 o se puede hacer parte de la tapa 219 (no

mostrado). La tapa o una sección de la misma pueden ser transparentes de manera que, en el caso de un sensor del tipo que cambia de color, se pueda evaluar los cambios en el color del sensor 220 a través de la tapa extrema 219. La  
5 tapa extrema 219 se puede fabricar de un material, tal como un polímero, que contenga micelios indicadores encapsulados.

Los sensores 120, 220 se pueden recolocar en el recipiente 110 o en el cuerpo del recipiente 210. En el  
10 caso en el que se empleen sensores de cambio de color, cada recipiente debería incluir al menos una sección transparente (o translúcida) adjunta al sensor 120, 220. Alternativamente, los sensores 120, 220 cada uno puede estar formado (por ejemplo, moldeado) como una parte  
15 integral del recipiente respectivo 110 o cuerpo de recipiente 210. Los sensores 120, 220 también se pueden colocar fuera del recipiente, mientras que se proporcionen medios de comunicación fluida sellados (desde el ambiente) para los productos metabólicos de los microorganismos o el  
20 medio de crecimiento que contiene el espécimen para reaccionar con el sensor.

Los dispositivos ya mencionados 100, 200 y los métodos y variaciones de los mismos tal como se han descrito anteriormente proporcionan un número de ventajas.  
25 La muestra se puede recoger, incubar y evaluar sin romper la barrera de esterilidad. Los dispositivos y los métodos sirven para combinar ciertas etapas de preparación de una muestra y detección del crecimiento microbiano en la muestra. Los dispositivos y métodos eliminan o reducen la  
30 manipulación de diversos componentes, proporcionan así conveniencia aumentada y mayor seguridad frente a contaminación inadvertida durante el ensayo y la evaluación. En particular, se protegen la muestra, el

filtro, el sensor y las porciones interiores adjuntas del recipiente de la contaminación, reduciendo así o eliminando el riesgo de un falso positivo causado por microorganismos no introducidos desde el espécimen original.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de filtración y detección integrado para la recogida y detección del crecimiento de microorganismos en un espécimen, comprendiendo dicho  
5 dispositivo:
- a) un recipiente que delimita una cámara en el mismo y que tiene una entrada y una salida en la comunicación fluida con dicha cámara;
  - b) un filtro montado en dicha cámara entre dicha  
10 entrada y dicha salida; y
  - c) un sensor montado en dicha cámara, dicho sensor operativo para detectar o indicar un cambio en la cámara causado por crecimiento microbiano.
2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación  
15 1, en el que dicho filtro es un filtro microporoso.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho filtro es un filtro de flujo radial.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho sensor es sensible a al menos un cambio en pH o en  
20 presencia de CO<sub>2</sub>.
5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho sensor es operativo al cambio de color en respuesta a al menos un cambio en pH o en presencia de CO<sub>2</sub> en dicha cámara.
- 25 6. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho sensor se asegura a una superficie interior de dicho recipiente.
7. El dispositivo de la reivindicación 6, en el que dicho sensor se une a dicha superficie interior de dicho  
30 recipiente.
8. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho recipiente tiene una sección transparente y los

cambios de dicho sensor son detectables a través de dicha sección transparente.

9. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho recipiente está formado de un plástico.

5 10. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho sensor y dicho filtro están dispuestos en extremos opuestos de dicha cámara.

11. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho recipiente incluye un cuerpo de recipiente y una tapa  
10 extrema desmontable.

12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 11 que incluye un sello anillo en O ("O-ring") entre dicho cuerpo de recipiente y dicha tapa extrema.

13. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación  
15 11, en el que dicha entrada y dicha salida están formadas en dicha tapa extrema.

14. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende una sección transparente, el filtro es un filtro microporoso y dicho  
20 sensor es operativo al cambio de color en respuesta a al menos un cambio en pH o en presencia de CO<sub>2</sub> en dicha cámara debido al crecimiento microbiano en el que los cambios del color de dicho sensor son detectables a través de dicha sección transparente.

25 15. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que el filtro es un filtro de flujo radial.

16. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que dicho sensor se asegura a una superficie interior de dicho recipiente.

30 17. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que dicha cámara tiene un volumen de entre aproximadamente 10 mililitros y 1 litro.

18. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que dicho recipiente está formado de un plástico.

19. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que dicho sensor y dicho filtro están dispuestos en extremos  
5 opuestos de dicha cámara.

20. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que dicho recipiente incluye un cuerpo de recipiente y una tapa desmontable, dicha entrada y dicha salida están formadas en dicha tapa extrema, incluyendo dicho dispositivo un sello  
10 de anillo en O("O-ring") entre dicho cuerpo de recipiente y dicha tapa extrema.

21. Un método para recoger y detectar el crecimiento de los microorganismos en un espécimen, comprendiendo dicho método las etapas de:

15 a) proporcionar un dispositivo de filtración y detección integrado que incluye:

- un recipiente que delimita una cámara en el mismo y que tiene una entrada y una salida en la comunicación fluida con la cámara;

20 - un filtro montado en la cámara entre dicha entrada y dicha salida; y

- un sensor montado en la cámara, dicho sensor operativo para detectar o indicar un cambio en la cámara causado por crecimiento microbiano;

25 b) pasar el espécimen dentro de la cámara a través de la entrada, a través del filtro y fuera de la cámara a través de la salida para recoger los microorganismos en el filtro; y a continuación

c) detectar cambios del sensor.

30 22. El método de la reivindicación 21 que incluye la etapa de introducción de un medio de cultivo dentro de la cámara seguido de dicha etapa de paso del espécimen.

23. El método de la reivindicación 22 incluyendo además la etapa de paso de un fluido de lavado dentro de la cámara a través de la entrada, a través del filtro y fuera de la cámara a través de la salida entre dichas etapas de paso del espécimen e introducción de un medio de cultivo dentro de la cámara.

24. El método de la reivindicación 21 que incluye la etapa de colocación del dispositivo en una ranura de un aparato de medición, siendo el aparato de medición operable para detectar cambios del sensor.

25. El método de la reivindicación 21 que incluye la etapa de evaluación de manera automática y electrónica del sensor usando el aparato de medición.

26. El método de la reivindicación 21 que incluye la etapa de incubación de los microorganismos en la cámara.

27. El método de la reivindicación 21, en el que dicho sensor y dicho filtro se retienen en dicha cámara durante y entre dichas etapas de paso del espécimen y detección de cambios del sensor.

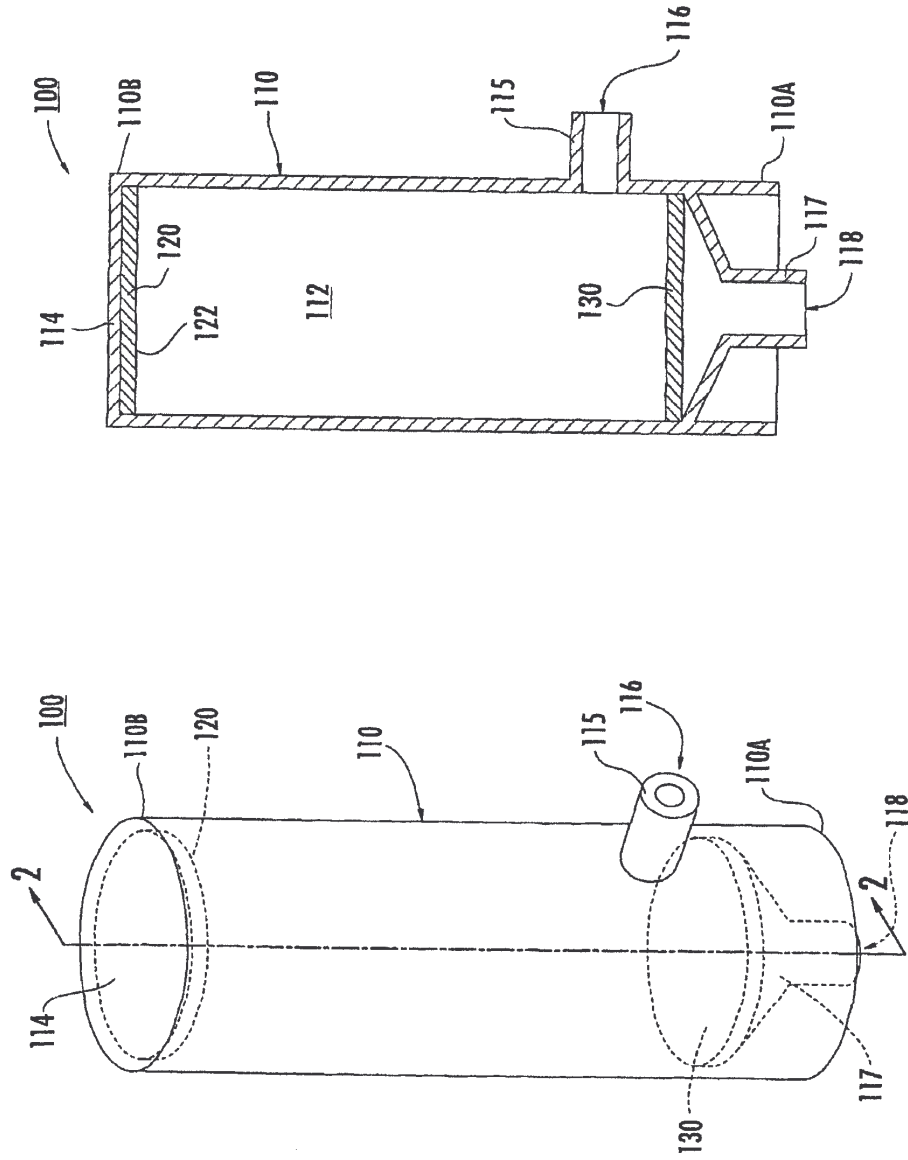
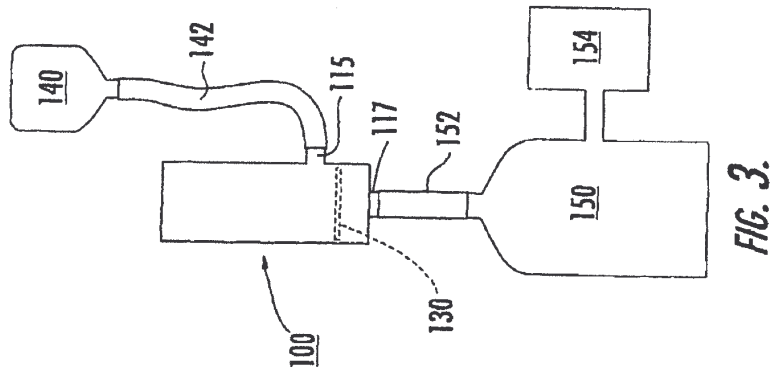
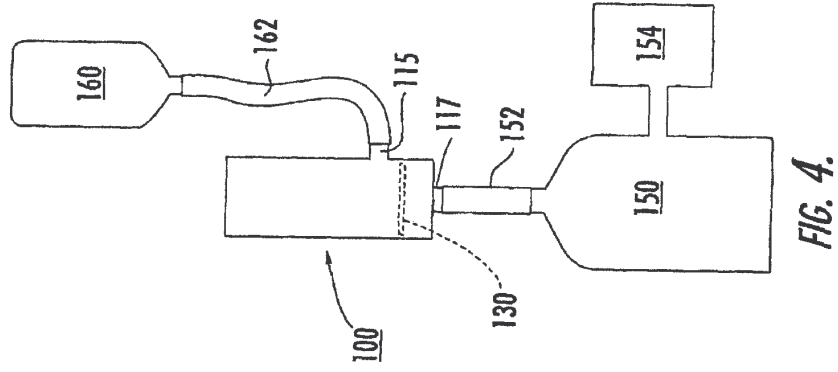
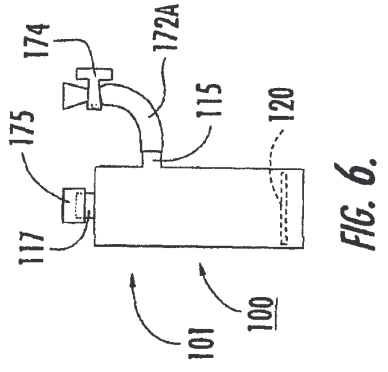
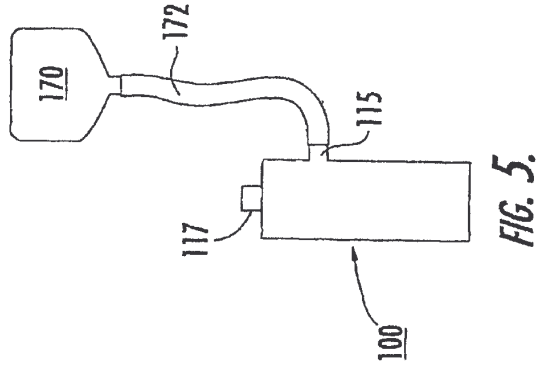


FIG. 2.

FIG. 1.



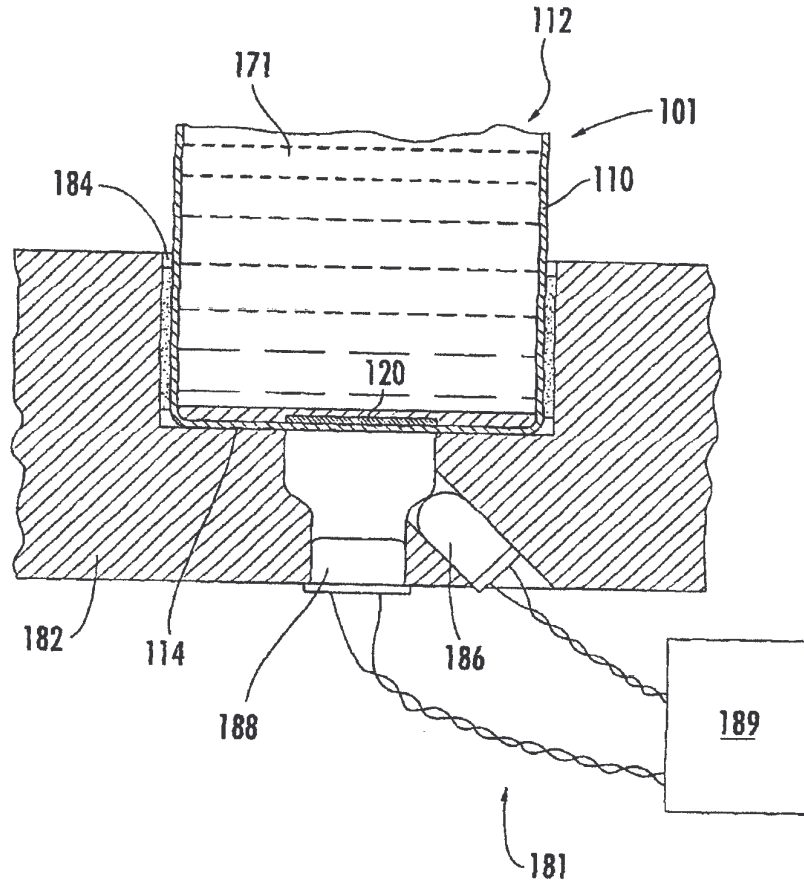


FIG. 7.

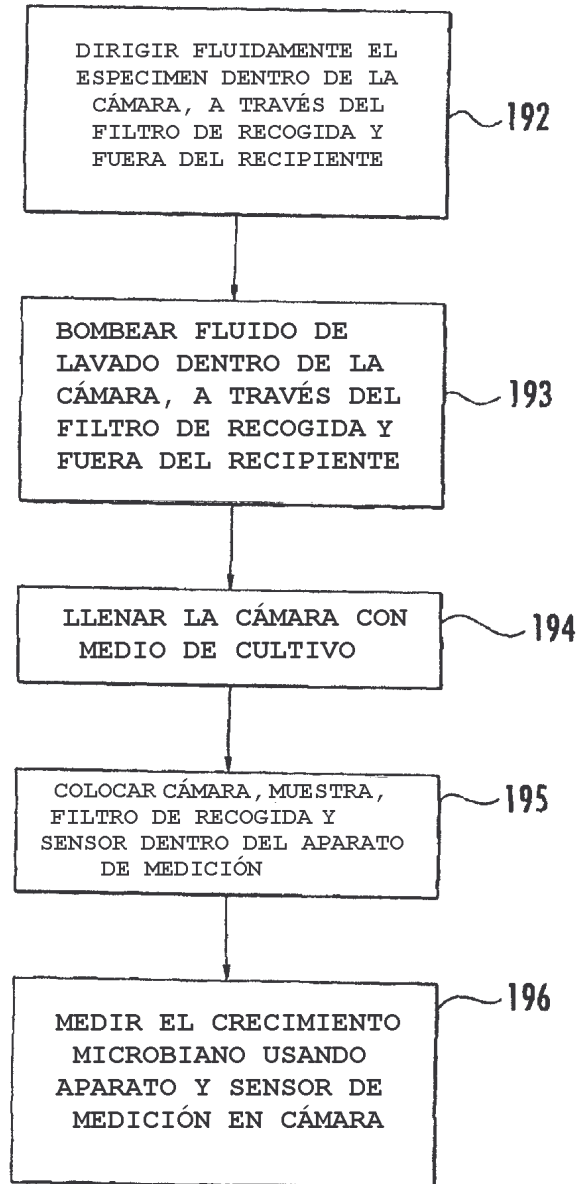


FIG. 8.

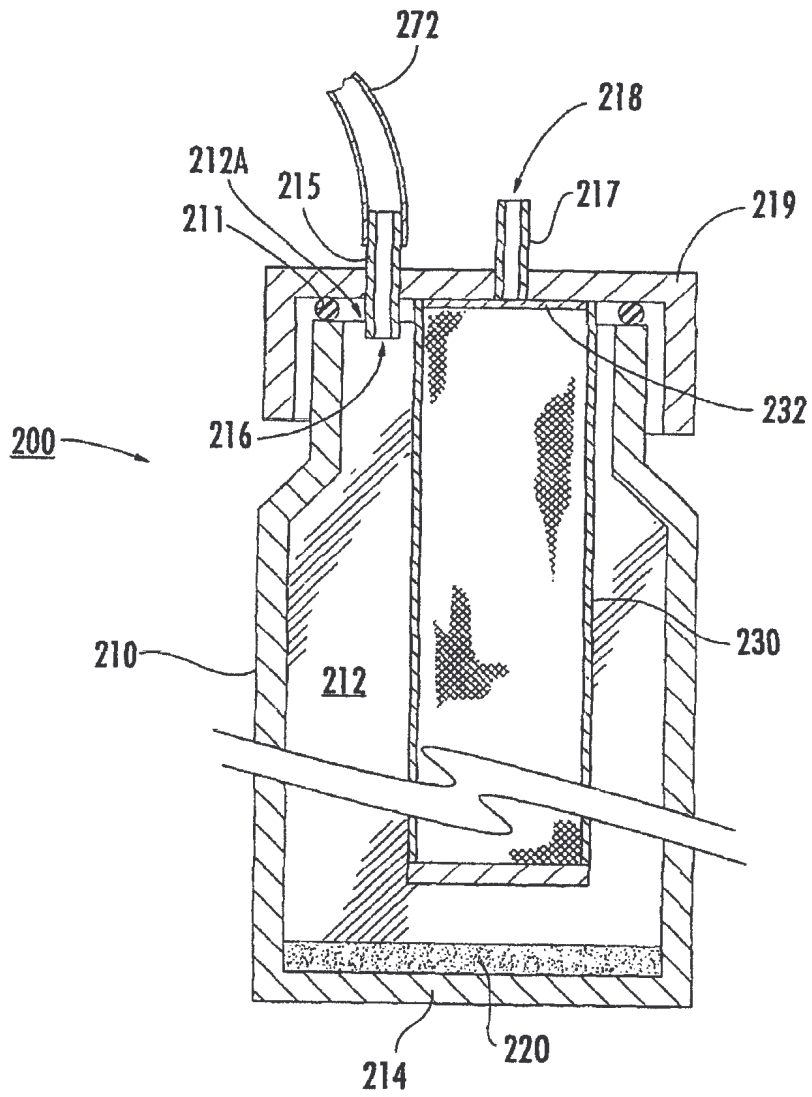


FIG. 9.