



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 254**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02710186 .4**
86 Fecha de presentación : **05.02.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1360274**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2003**

54 Título: **Detección de microorganismos.**

30 Prioridad: **05.02.2001 GB 0102790**
07.11.2001 GB 0126674

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

72 Inventor/es: **Keenan, Elizabeth Ann y**
Brennan, Michael Steel

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de microorganismos.

5 El presente invento se refiere a métodos mejorados para detectar microorganismos, particularmente levaduras y bacterias, en mezclas coloidales tales como la cerveza. También se refiere a la detección de microorganismos en el aire y en muestras sólidas (tales como alimentos o esporas bacterianas) que pueden ser puestas en una suspensión en fase líquida o ser disueltas.

10 La producción de productos alimenticios y bebidas tales como la cerveza va acompañada del análisis de la presencia de ciertos microorganismos con el fin de asegurar la calidad del producto final. Por ejemplo, el proceso de fabricación de cerveza puede requerir el análisis en cadena, cada pocas horas, de una muestra que tiene un volumen de al menos 25 ml, y preferiblemente muestras que tienen volúmenes de, por ejemplo, 250 ml. Luego debe separarse materia corpuscular, que puede incluir microorganismos, es decir, levaduras y bacterias, de la muestra y analizarse
15 para determinar la presencia o ausencia de microorganismos específicos. Los dispositivos utilizados para llevar esto a cabo incluyen la unidad desechable Bibby de filtración por vacío, que tiene un filtro plano con un diámetro medio de poro de 0,45 μm , y los soportes de filtración Nalgene con depósitos, que tienen un filtro plano con un diámetro medio de poro de 0,45 μm o 0,2 μm (véase, por ejemplo, el catálogo de productos para laboratorio de Merck, 1998, página 482). Dichos dispositivos permiten la filtración de volúmenes de muestra máximos de sólo 100 ml y tienen una
20 superficie plana con un área de 50 cm^2 , y con ellos se pueden tardar hasta 30 minutos en analizar una muestra a causa de la complejidad de su uso. Una vez que se ha filtrado su volumen máximo, resultan bloqueados por materia corpuscular tal como las proteínas presentes en el fluido de muestra (por ejemplo, cerveza rubia, cerveza inglesa y otras disoluciones coloidales), y toda filtración subsiguiente requeriría presiones tan elevadas que causarían lisis celular, lo que evitaría la detección de los microorganismos y generaría resultados falsos.

25 Con los dispositivos de la técnica anterior se tarda sustancialmente más tiempo en separar y detectar los microorganismos de una muestra que con los dispositivos y métodos del presente invento. En el Documento WO 01/11006 se describen mejoras a la técnica anterior que permiten una separación y una detección más rápidas de microorganismos, así como una subsiguiente recuperación y, por lo tanto, un análisis, relativamente simple y fácil de microorganismos.

30 En el Documento WO 00/23792 se describe un método para concentrar un microorganismo en una muestra mediante la puesta de la muestra en contacto con una matriz celulósica o de quitina.

35 En el Documento DE 19814715 se describe un método para detectar microorganismos en gases al hacer pasar el gas a través de membranas filtrantes de gelatina, membranas que son posteriormente descritas.

En el Documento WO 98/04675 se describe el uso de una cápsula desechable para filtración, con un elemento de membrana filtrante no obstruido.

40 En el Documento EP 0.439.121 se describe un ensayo de tipo sándwich para detectar *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Los dispositivos y métodos del presente invento son distintos de los de la técnica anterior, y, en particular (como se detalla más adelante), los métodos implican una operación de lavado en vez de sólo una operación de resuspensión.

45 Los dispositivos y métodos del presente invento mejoran además los del Documento WO 01/11006 y los de otros de la técnica anterior al proporcionar un método aún más rápido y simple para la separación y detección de los microorganismos de una muestra.

50 En particular, se ha hallado que los dispositivos del presente invento permiten detectar rápidamente todas las bacterias en, por ejemplo, un volumen de 100 ml de disolución de ensayo que contiene tan sólo 1-3 bacterias. También se pueden alcanzar resultados similares con volúmenes mayores, por ejemplo, 1000 ml, de cerveza rubia que contienen 1-3 bacterias.

55 De acuerdo con el presente invento, se proporciona un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra fluida, que comprende las operaciones de:

60 i) hacer pasar dicha muestra a través del orificio de entrada de muestras de un dispositivo filtrante que comprende una pluralidad de membranas filtrantes de fibra hueca a las que está fijado un miembro primero de una pareja de unión específica (sbp; del inglés, specific binding pair), en que dicho microorganismo presenta el miembro segundo de dicha pareja de unión específica, en que dichas membranas tienen unos extremos primero y segundo, una superficie externa y una superficie interna que define un canal central, en que dicho extremo primero de cada una de dichas membranas está abierto y se comunica con dicho orificio de entrada de muestras y en que el flujo a través de dicho extremo segundo de cada una de dichas membranas está
65 limitado para que dicho flujo se produzca sólo a través de dicho extremo primero y los poros de dichas membranas, y en que la mezcla de muestra se filtra a través de los poros de dichas membranas para dejar un producto de filtración en dicho canal central de dichas membranas;

- ii) separar por lavado la parte no unida de dicho producto de filtración procedente de dicho canal central de dichas membranas;
- iii) detectar la presencia de cualquiera de dichas parejas de unión específicas fijada a dichas membranas; y
- iv) correlacionar los resultados de la operación (iii) de detección con la presencia de dicho microorganismo en dicha muestra fluida.

La muestra puede tener, por ejemplo, un volumen de al menos, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900 ó 1000 ml.

Un “miembro de una pareja de unión específica” es una de dos moléculas diferentes que ocupa un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a, y es por ello definida como complementaria de una particular organización espacial y polar de, la otra molécula. A los miembros de la pareja de unión específica se hace comúnmente referencia como ligando y receptor (antiligando), miembro de la sbp y compañero de la sbp, miembros de la sbp, y similares. Estos son normalmente miembros de una pareja inmunológica, tal como un antígeno-anticuerpo, aunque la expresión tiene un significado más amplio que abarca otras parejas de unión específicas.

El término “anticuerpo”, en sus diversas formas gramaticales, se usa aquí para referirse a moléculas inmunoglobulínicas y a porciones inmunológicamente activas de moléculas inmunoglobulínicas, es decir, moléculas que contienen un paratopo o sitio de combinación de un anticuerpo. A dichas moléculas se hace también referencia como “fragmentos de unión al antígeno” de moléculas inmunoglobulínicas.

Por “fijado” se quiere significar que el miembro primero de la pareja de unión específica está físicamente estreñado y presenta impedimento u obstáculo para separarse de la membrana. Esto puede ser por medio de la unión covalente a la membrana, por ejemplo, de un anticuerpo a la membrana, o puede ser por otro medio, tal como, por ejemplo, por fuerzas de van der Waals. De esta manera, el miembro primero de una pareja de unión específica, tal como un anticuerpo, puede ser sencillamente retenido por las fibras de una membrana y no es necesario que esté covalentemente unido a ella.

En particular, se pueden unir covalentemente anticuerpos y otros miembros primeros de parejas de unión específicas a membranas de polipropileno entrecruzándolos con glutaraldehído. Los métodos de entrecruzamiento serán muy evidentes para una persona experta en la técnica y pueden ser llevados a cabo mediante, por ejemplo, la oxidación o halogenación de los grupos polipropileno hasta un monómero reactivo.

Con objeto de analizar muestras que no están en fase líquida, tales como, por ejemplo, muestras de aire o materia corpuscular u otros sólidos tales como productos alimenticios, aquéllas deben ser puestas primero en una suspensión fluida. Hay dos situaciones básicas en que se hace esto: el análisis de aire u otras muestras gaseosas en cuanto a la presencia de microorganismos y el análisis de sólidos tales como polvos y productos alimenticios en cuanto a la presencia de microorganismos.

1. Análisis de muestras gaseosas

Con objeto de analizar una muestra gaseosa, tal como aire, en cuanto a la presencia de un microorganismo concreto, se emplea un dispositivo para filtración de aire (es decir, de gas) que tiene poros con un diámetro suficiente para retener el microorganismo elegido. Por ejemplo, en el caso del ántrax (*Bacillus anthracis*), que tiene un diámetro de 1 μm , se puede usar un tamaño de poro de, por ejemplo, 0,2 μm . El dispositivo para filtración de aire puede comprender también un ventilador para potenciar el flujo de aire a través del filtro, y se puede hacer pasar un gran volumen de aire a través del filtro en un período de tiempo relativamente pequeño, quedando retenida toda la materia corpuscular de tamaño superior al diámetro de poro. El filtro es luego puesto en contacto con un fluido de muestras (por ejemplo, un tampón u otra disolución, fluido o mezcla en que se pueda suspender o solubilizar el microorganismo dado) en que se puede suspender o solubilizar el microorganismo, y los microorganismos retenidos son puestos en suspensión o son solubilizados según sea apropiado (es decir, en fase fluida). Una vez que se ha completado esta fase inicial de captura de microorganismos y de puesta de los mismos en suspensión/solubilización, se puede desarrollar el resto del método del presente invento [es decir, operaciones (i) - (iv) como las anteriormente definidas].

La naturaleza exacta del fluido de muestras, tal como un tampón u otra disolución, fluido o mezcla en que se pueda solubilizar o suspender el microorganismo dado, depende de la naturaleza del propio microorganismo y del miembro primero de la pareja de unión específica utilizada en la operación (i) anterior. La función del fluido de muestras es permitir que el microorganismo dado interaccione con el miembro primero de la pareja de unión específica para que se pueda formar la pareja de unión específica del modo apropiado para permitir la detección del microorganismo dado. Por ejemplo, el miembro primero de la pareja de unión específica puede formar una pareja de unión específica con el microorganismo o con un microorganismo dado y, de este modo, se puede efectuar su detección, correlacionándose la formación de una pareja específica con la presencia del microorganismo dado.

2. Análisis de sólidos

Con objeto de analizar un sólido, tal como un producto alimenticio (por ejemplo, un pastel o pan), en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, el sólido es puesto en contacto con un fluido de muestras en el cual se puede suspender o solubilizar el microorganismo, y los microorganismos retenidos son puestos en suspensión o son solubilizados según sea apropiado. Como antes, una vez que se ha completado esta fase inicial de captura de microorganismos y de puesta de los mismos en suspensión/solubilización, se puede desarrollar el resto del método del presente invento [es decir, operaciones (i) - (iv) como las anteriormente definidas].

Por lo tanto, de acuerdo con el presente invento, se proporciona también un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra sólida, que comprende las operaciones de:

a) poner dicha muestra sólida en contacto con un fluido de muestras de modo que dicho microorganismo quede en fase fluida, para obtener una muestra fluida; y

b) llevar a cabo el método de las operaciones (i) - (iv) sobre dicha muestra fluida.

Otro ejemplo del análisis de sólidos es el análisis del contenido de un envase tal como una carta. Se lleva el método anterior a cabo; es decir, se pone el sólido en contacto con un fluido de muestras y luego se llevan a cabo las operaciones (i) - (iv) para determinar la presencia del microorganismo dado. Sin embargo, el contenido del envase debe ser primero extraído. Con el fin de realizar esto, el presente invento proporciona un aparato que comprende una primera cámara en que se puede poner dicho envase, una segunda cámara que contiene un fluido de muestras, y un medio (tal como una bomba o una jeringa) para alterar la presión relativa en dichas cámaras primera y segunda, comunicándose dicha segunda cámara con dicha primera cámara por medio de un elemento perforador que tiene un canal central a través del cual se puede producir el flujo.

El presente invento también proporciona un método para analizar el contenido de un envase en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, que comprende poner dicho envase en dicha primera cámara, alterar la presión relativa de aire en dichas cámaras primera y segunda, y poner dicho envase en contacto con dicho elemento perforador de modo que dicho envase resulte perforado y la materia sólida de dicho envase, particularmente la materia corpuscular, pase de dicho envase a dicho fluido de muestras y resulte suspendida o solubilizada en dicho fluido de muestras para obtener una muestra fluida. Luego se lleva a cabo el método de las operaciones (i) - (iv) sobre la muestra fluida y se detectan en ella los microorganismos.

Por lo tanto, de acuerdo con el presente invento, se proporciona un método para analizar el contenido de un envase en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, que comprende las operaciones de:

a) poner dicho envase en una primera cámara que se comunica, por medio de un elemento perforador, con una segunda cámara que contiene un fluido de muestras;

b) poner dicho envase en contacto con dicho elemento perforador para que toda materia sólida de dicho envase pueda pasar a dicho fluido de muestras de dicha segunda cámara a través de dicho elemento perforador, para obtener una muestra fluida; y

c) llevar a cabo el método de las operaciones (i) - (iv) sobre dicha muestra fluida.

El método puede comprender además la operación de efectuar un cambio de la presión gaseosa relativa en dichas cámaras primera y segunda para que la presión en dicha primera cámara sea mayor que la presión en dicha segunda cámara. De este modo puede potenciarse o efectuarse el movimiento de toda materia sólida, tal como materia corpuscular, desde el envase situado en la primera cámara hasta la segunda cámara.

Con objeto de permitir que el envase sea retirado con seguridad de dicho aparato, éste puede proporcionarse con una almohadilla autoselladora que está en contacto con el elemento perforador; tras su separación del elemento perforador, la almohadilla se autosellará, evitando toda salida adicional de sólido del envase y haciendo segura su retirada del aparato.

El elemento perforador puede estar sellado de modo que se rompa el sello tras la perforación del envase; de este modo es posible mantener una diferencia de presiones entre las cámaras primera y segunda, estando reducida la presión en la segunda cámara con respecto a la presión en la primera. Alternativamente, pueden alterarse las presiones en las cámaras una vez que haya tenido lugar la perforación. El elemento perforador puede ser autosellador. De esta manera, de acuerdo con el presente invento, también se proporciona un método para analizar el contenido de un envase en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, que comprende poner dicho envase en dicha primera cámara, poner dicho envase en contacto con dicho elemento perforador para que dicho envase resulte perforado y la materia sólida de dicho envase, particularmente la materia corpuscular, pueda pasar de dicho envase a dicho tampón de muestras (o dicha otra disolución, fluido o mezcla en que se puede suspender o solubilizar el microorganismo dado), y reducir la presión de aire en dicha segunda cámara con respecto a la presión en dicha primera cámara para que dicha materia sólida pase de dicho envase a dicho tampón de muestras y resulte suspendida o solubilizada en dicho tampón de muestras (o dicha otra disolución, fluido o mezcla en que se puede suspender o solubilizar el microorganismo dado).

Alternativamente, por supuesto, es posible no generar diferencia de presión alguna entre las cámaras primera y segunda y efectuar la transferencia de materia sólida entre las dos cámaras mediante, por ejemplo, gravedad.

En todos estos casos de análisis de gases y sólidos en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, el presente invento proporciona la clara ventaja de proporcionar resultados rápidos y precisos. El tiempo que dura el ensayo de una muestra puede ser muy inferior al de otros ensayos comparables, tales como el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorption assay) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction). Un tiempo típico de ensayo al usar el presente invento es 15 minutos. En el caso del muestreo de aire, se pueden hacer pasar volúmenes muy grandes de aire a través del filtro (por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 ó 10.000 l de aire) y se puede analizar la materia corpuscular retenida en un periodo muy corto de tiempo; de nuevo, es típico un tiempo de ensayo de 15 minutos. Por lo tanto, estos métodos de ensayo para microorganismos permiten análisis de modos previamente no sugeridos y permiten una generación de resultados muy rápida, lo que no había sido posible alcanzar previamente.

Por supuesto, el presente invento, con su análisis de muestras fluidas en cuanto a la presencia de microorganismos, puede ser también utilizado para el análisis de muestras fluidas en cuanto a la presencia de, por ejemplo, ántrax con el uso de, por ejemplo, un anticuerpo antiántrax como miembro primero de una pareja de unión específica.

Así como para el análisis de ántrax, el presente invento puede ser también usado para analizar cualesquier otros microorganismos que puedan ser utilizados en la guerra biológica.

La muestra es hecha pasar a través de las membranas filtrantes bajo unas condiciones que permiten la unión de los miembros primero y segundo de la pareja de unión específica. Si se desea o es necesario reducir la posibilidad de unión de grupos distintos al miembro segundo de la pareja de unión específica con el miembro primero de la pareja de unión específica, pueden utilizarse condiciones de unión más rigurosas (también referidas como “hibridación rigurosa”). Por ejemplo, se puede variar la temperatura o el pH para proporcionar condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación apropiadas dependerán de la naturaleza de los miembros de la pareja de unión específica y resultarán muy evidentes a un experto en la técnica.

Obviamente, en la operación (ii) de lavado, es esencial que las parejas de unión específicas unidas no sean eliminadas del canal central de las membranas por lavado, y, de ese modo, la operación de lavado separe un producto de filtración distinto a cualesquier miembros segundos de la pareja de unión específica que se hayan unido a los miembros primeros de la pareja de unión específica fijados a las membranas. Por supuesto, es posible que de vez en cuando una pareja de unión específica pueda llegar a soltarse de las membranas y a eliminarse, junto con el producto de filtración no unido, del canal central de las membranas por lavado. Aunque esto puede suceder de vez en cuando, sustancialmente todos (es decir, esencialmente todos) los miembros primeros de la pareja de unión específica que se han unido a los miembros segundos de la pareja de unión específica permanecen fijados a las membranas.

La operación (iii) de detección puede tomar una de muchas formas. Por ejemplo, la pareja de unión específica puede ser detectada por la unión de una sonda marcada, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de detección que lleva incorporado una enzima [el clásico ensayo de inmunoabsorción con enzimas (EIA; del inglés, enzyme immunosorbent assay)], a la pareja o al microorganismo. Alternativamente, la sonda puede ser un anticuerpo radiomarcado o un anticuerpo fluorescentemente marcado. Otras ondas resultarán bien evidentes a una persona experta en la técnica.

Alternativamente, se puede eluir (es decir, separar) el microorganismo del miembro primero de la pareja de unión específica y se puede emplear una operación de detección distinta. Por ejemplo, se puede lisar el microorganismo eluido y se puede detectar el ATP liberado usando un ensayo de luciferasa. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos específicos para el microorganismo, o se puede sembrar el producto de elución en un medio de cultivo nutritivo general (o específico para el microorganismo) y detectar el crecimiento de las colonias de cualquier microorganismo. El producto de elución puede ser también analizado usando sondas oligonucleótidas específicas para el microorganismo en un ensayo de PCR convencional.

La variedad de operaciones de detección asequibles para uso en el presente invento también significa que las membranas pueden tener fijadas miembros primeros de una pluralidad de parejas de unión específicas. Los diferentes miembros primeros pueden ser mezclados entre sí y ser fijados a todas las membranas, o los miembros primeros de una pareja de unión específica dada pueden ser fijados a las membranas en una posición específica. La operación de detección empleada puede permitir la detección y/o cuantificación generales de las parejas de unión específicas o puede permitir la detección y/o cuantificación de una pareja o parejas de unión específicas escogidas. Por ejemplo, se podría detectar la presencia de una primera pareja de unión específica usando un primer fluoróforo y se podría detectar la presencia de una segunda pareja de unión específica usando un radiomarcador o mediante el uso de un segundo fluoróforo que tuviera un espectro de excitación y/o emisión distinguible del espectro del primer fluoróforo.

Los dispositivos de la técnica anterior presentan típicamente la materia corpuscular separada por filtración como una “galleta” dura (un bloque de alta densidad y relativamente muy comprimido de materia corpuscular) en una superficie de la membrana, con los microorganismos y otra materia corpuscular bloqueando, y quedando retenidos en, intersticios de la membrana. Esta galleta es difícil de separar y difícil de procesar para que se pueda analizar en ella la presencia de microorganismos.

La configuración de los dispositivos del presente invento da lugar a la formación de una “torta” resuspendible que puede ser posteriormente lavada, y permite el uso de menores presiones durante la filtración, lo que a su vez evita la formación de una galleta densa y la necesidad de presiones más elevadas. Si se trabaja a presiones más elevadas, se puede producir la lisis de bacterias, lo que proporciona a su vez resultados incorrectos. Una presión elevada puede también causar la deformación de las bacterias, permitiéndolas pasar a través de la membrana y proporcionando resultados incorrectos.

Los métodos y dispositivos de filtración de la técnica anterior incluyen los de los Documentos GB 2135902, EP 302949, WO 94/00222, WO 84/00015, US 5863501, US 5814179, US 4501793, JP 4-135478 (Extracto WPI 1992-205001), JP 63-104615 (Extracto WPI 1988-165566), JP 63-088007 (Extracto WPI 1988-145060) y JP 61-133105 (Extracto WPI 1986-200908). Sin embargo, en ninguno de ellos se describen ni sugieren los métodos del presente invento, incluyendo cada una de las operaciones necesarias para obtener los resultados que son capaces de proporcionar. En particular, en la técnica anterior no se sugiere la producción de un producto de filtración en forma de una “torta” resuspendible en lugar de una “galleta” más sólida, ni se sugiere el lavado del producto de filtración de las membranas como parte de una subsiguiente operación de procesamiento.

Por ejemplo, en el Documento JP 63-104615 se describe un dispositivo para separar, por ejemplo, virus de fluidos, que comprende una pluralidad de fibras porosas y huecas de celulosa, estando un extremo de ellas abierto a la atmósfera y embebido en un material de relleno y estando el otro extremo sellado. Sin embargo, no se sugieren los métodos específicos del presente invento ni sus ventajas. También se conocen otros dispositivos de filtración, tal como, por ejemplo, el filtro de fibra hueca CultureGard de Cole Parmer (www.coleparmer.com; código de producto: EW-29510-50).

Se ha hallado que se pueden usar ventajosamente membranas de fibra de polipropileno (en el anterior producto de Cole Parmer se utilizan membranas de fibra hueca de celulosa).

En particular, las membranas pueden ser tratadas con un agente humectante tal como isopropanol y/o un detergente tal como Tween-20 para hacerlas más hidrófilas y más susceptibles a la fijación del miembro primero de la pareja de unión específica. Más adelante se muestran los sorprendentemente buenos resultados alcanzados al tratar las membranas con isopropanol antes de fijar anticuerpos a ellas. Por ejemplo, una membrana puede ser empapada en isopropanol y ser luego dejada secar, antes del tratamiento con Tween 20 (típicamente, 0,1%) y el anticuerpo.

Se ha hallado que, mediante el pretratamiento de las membranas con un agente humectante tal como un alcohol, se aumenta enormemente el caudal de la mezcla de muestra a través de las membranas. Esto es particularmente cierto cuando se comparan membranas tratadas y secadas con membranas secas no tratadas. Este caudal aumentado asegura que los microorganismos sean recogidos sin causarles lisis ni forzarles a través de las membranas.

Los detergentes útiles incluyen detergentes no iónicos, particularmente Tween 20, más particularmente una disolución de Tween 20 al 5%.

El uso de una pluralidad de membranas filtrantes de fibra hueca también proporciona un área superficial relativamente grande (típicamente al menos tres veces mayor) a través de la cual puede tener lugar la filtración, en comparación con el área superficial proporcionada por un solo dispositivo de dimensiones (es decir, tamaño) globales similares que tiene una sola membrana plana. Esto también permite la filtración de un volumen relativamente grande de muestra antes de que tenga lugar cualquier bloqueo de los poros. Esto es particularmente útil con muestras turbias (por ejemplo, la cerveza negra) que contienen grandes cantidades de materia corpuscular que pueden bloquear rápidamente las membranas filtrantes planas.

Se ha hallado también que es importante la naturaleza exacta del material de la membrana filtrante; se ha hallado que las membranas de fibra hueca de polipropileno comercialmente asequibles que tienen un diámetro medio de poro de 0,2 μm y han sido pretratadas con isopropanol permiten caudales mucho mayores que, por ejemplo, las membranas de polisulfona que tienen un diámetro medio de poro de 0,2 μm , incluso cuando han sido idénticamente pretratadas. De este modo, en una realización preferida del presente invento, la membrana de fibra hueca es una membrana de polipropileno. Naturalmente, también se pueden utilizar otras membranas, particularmente aquellas que tienen unas características físicas similares, por ejemplo, un similar diámetro medio de poro y una similar área de poros por unidad de área de la superficie de la membrana, y aquéllas incluyen las membranas similares de polisulfona, acetato de celulosa y nailon.

Las membranas de fibra hueca utilizadas en el presente invento pueden tener un diámetro medio de poro de 0,2 μm .

De acuerdo con el presente invento, también se proporciona un dispositivo que tiene un orificio de entrada de muestras y una pluralidad de membranas filtrantes de fibra hueca a las que está fijado un miembro primero de una pareja de unión específica, en que un microorganismo dado presenta el miembro segundo de dicha pareja de unión específica, en que dichas membranas tienen unos extremos primero y segundo, una superficie externa y una superficie interna que define un canal central, en que dicho extremo primero de cada una de dichas membranas está abierto y se comunica con dicho orificio de entrada de muestras y en que el flujo a través de dicho extremo segundo de cada una de dichas membranas está limitado para que dicho flujo se produzca sólo a través de dicho extremo primero y los poros

de dichas membranas, de modo que una mezcla de muestra que entra en dicho dispositivo a través de dicho orificio de entrada de muestras se filtra a través de los poros de dichas membranas para dejar un producto de filtración en dicho canal central de dichas membranas.

5 La facilidad para analizar microorganismos al usar los métodos y dispositivos viene complementada por la velocidad de filtración; como muestran los resultados experimentales, el presente invento permite la detección de microorganismos específicos en un volumen dado de fluido de muestra en una fracción del tiempo requerido por otros dispositivos, y es frecuentemente al menos diez veces más rápido.

10 El presente invento también proporciona la importante ventaja de proporcionar resultados consistentes para una muestra dada, incluso cuando se filtra una mezcla muy turbia; es fácilmente alcanzable una consistencia de al menos 99% entre grupos diferentes de resultados. Esto se compara favorablemente con los resultados obtenidos al usar membranas planas, que pueden ser relativamente inconsistentes.

15 En diversas realizaciones del presente invento, las membranas de fibra hueca consisten en polipropileno, el cual se utiliza en muchas aplicaciones biomédicas a causa de su baja capacidad para absorber proteínas. No se ha sugerido previamente que membranas de polipropileno tengan anticuerpos u otros miembros de parejas de unión específicas fijados a ellas. En particular, el presente invento muestra que al tratarse las membranas de polipropileno con isopropanol como aquí se describe, los miembros de parejas de unión específicas permanecen fijados a las membranas incluso
20 cuando éstas son lavadas con detergentes tales como dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, sodium dodecylsulfate) y Tween-20. Esto no se había sugerido previamente.

El invento resultará más evidente a partir de la descripción siguiente con referencia a las diversas figuras de los dibujos adjuntos, los cuales muestran, sólo a modo de ejemplo, una forma del dispositivo filtrante.

25 En las figuras:

la Figura 1 muestra un primer dispositivo de acuerdo con el presente invento y su uso en un método para la detección de microorganismos;

30 la Figura 2 muestra un corte a través de una tapa terminal, y una vista superior de un collar del dispositivo de la Figura 1;

la Figura 3 muestra una fotografía de membranas de polipropileno que tienen anticuerpos fijados a ellas: una
35 membrana (Tubo A, a la izquierda) que ha sido pretratada mediante empapamiento durante la noche en un tampón de carbonato/bicarbonato y la otra (Tubo B, a la derecha) que ha sido pretratada mediante empapamiento durante la noche en isopropanol; y

40 la Figura 4 muestra un dispositivo filtrante alternativo, utilizado en el presente invento.

A menos que se afirme otra cosa, todos los procedimientos fueron llevados a cabo usando protocolos estándares y siguiendo las instrucciones del fabricante cuando eran aplicables. Los protocolos estándares para diversas técnicas, incluyendo PCR, clonación, manipulación y secuenciación moleculares, fabricación de anticuerpos, mapeo de epítopos y diseño de mimótopos, cultivo celular y presentación en fagos, se describen en textos tales como M. J. McPherson
45 *et al.* (1991, "PCR: A practical approach", Oxford University Press, Oxford, Reino Unido), J. Sambrook *et al.* (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, EE.UU.), Huynh y Davies (1985, "DNA Cloning Vol. I - A Practical Approach", IRL Press, Oxford, Reino Unido, compilado por D. M. Glover), F. Sanger *et al.* (1977, PNAS USA 74(12): 5463-5467), E. Harlow y D. Lane ("Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU. 1998), G. Jung y A. G. Beck-Sickinger (1992, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 31: 367-486), M. A. Harris e I. F. Rae ("General Techniques of Cell Culture", 1997, Cambridge University Press, ISBN 0521 573645), "Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual" (compilado por B. K. Kay, J. Winter y J. McCafferty, Academic Press Inc., 1996, ISBN 0-12-402380-0).

Los reactivos y el equipo útiles en, entre otros, los métodos aquí detallados son asequibles de empresas tales como Amersham (www.amersham.co.uk), Boehringer Mannheim (www.boehringer-ingelheim.com), Clontech
55 (www.clontech.com), Genosys (www.genosys.com), Millipore (www.millipore.com), Novagen (www.novagen.com), Perkin Elmer (www.perkinelmer.com), Pharmacia (www.pharmacia.com), Promega (www.promega.com), Qiagen (www.qiagen.com), Sigma (www.sigma-aldrich.com) y Stratagene (www.stratagene.com).

60 Cuando se dan números de referencia "PMID" para publicaciones, son números de identificación de la base de datos PubMed asignados a ellas por la "US National Library of Medicine", a partir de los cuales se dispone de información bibliográfica completa y el extracto para cada publicación en www.ncbi.nlm.nih.gov. Esto también puede proporcionar el acceso directo a copias electrónicas de las publicaciones completas, particularmente en el caso de, por ejemplo, publicaciones de PNAS, JBC y MBC.

65 Los antígenos específicos de *Lactobacillus brevis* son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, de T. Yasui y K. Yoda [Appl. Environ. Microbiol., Noviembre de 1997: 63 (11): 4528-33; PMID: 9361439], T. Yasui y K. Yoda [FEMS Microbiol. Lett., 15 de Junio de 1997, 151 (2): 169-76; PMID: 9228750], y H. Shimohashi, S. Kodaira y N. Suegara

[Jpn. J. Microbiol. Octubre de 1976, 20 (5): 405-13; PMID: 62862], como los son los anticuerpos anti-*Lactobacillus brevis* [véanse, por ejemplo, Youichi Tsuchiya, Yasukazu Nakakita, Junji Watari y Ken Shinotsuka, 1999, American Society of Brewing Chemists (ASBC), Reunión Anual en Phoenix, Arizona, EE.UU., 19-23 de Junio, Extracto O-17].

5 Preparación de anticuerpos

Los microorganismos *L. brevis* de una disolución muy concentrada fueron matados mediante la adición de una disolución de formaldehído al 8% a temperatura ambiental durante 2-3 horas. Se obtuvo el sedimento celular por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos. El líquido fue separado y el sedimento celular fue lavado y fue resuspendido en agua desionizada estéril. Se repitió el procedimiento de centrifugación y lavado hasta que se hubo eliminado todo resto de formaldehído. Se resuspendió el sedimento celular final (inmunógeno) en 0,5 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) y se guardó la suspensión congelada hasta que se necesitó. Antes de la inyección del inmunógeno, se diluyeron 0,125 ml de inmunógeno con partes iguales de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Inc., número F5881 del catálogo). Esto proporciona la inyección primaria, con tres subsiguientes inyecciones de refuerzo que tienen el inmunógeno diluido en partes iguales de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Inc., nº F5506 del catálogo). Una muestra de la preparación antigénica resuspendida fue también analizada mediante siembra y recuento para asegurar que no quedaba célula viable alguna.

Se purificaron inmunoglobulinas de suero por cromatografía de afinidad con proteína A, suministrada por Sigma-Aldrich Inc., número PURE-1A del catálogo.

Pretratamiento de las membranas de fibra hueca

Membranas de polipropileno de fibra hueca (Membrana, Wuppertal, Alemania, número PP Q3/2 del catálogo), que tenían un tamaño nominal de poro de 0,2 μm y una longitud de 55 cm, fueron sumergidas durante la noche en isopropanol. Las membranas fueron luego secadas, sumergidas después en Tween-20 (5%) durante 20 minutos y finalmente secadas.

Preparación de membranas de fibra hueca

Se juntaron por un extremo treinta y cinco piezas de las membranas de fibra hueca pretradas (anteriores). Se aplicó un adhesivo de curación por luz UV a una pequeña sección de las membranas y, después de la aplicación, se deslizó un collar de 5 mm sobre la zona adhesiva. Luego se aplicó luz UV hasta que se curó el adhesivo (45 segundos). Se examinaron todas las membranas para asegurar que el canal central de las membranas estaba totalmente despejado. Luego se ajustó una tapa con un adaptador para jeringas al collar y se aseguró usando un adhesivo de curación por luz UV.

Se pusieron 5 ml de una dilución 1:10.000 de anticuerpo anti-*L. brevis* [dilución llevada a cabo en un tampón de carbonato/bicarbonato 0,1 M (Sigma, número C3041 del catálogo)] en una jeringa y se fijó ésta a la tapa de las membranas. Se cerró el otro extremo de las membranas utilizando unas tenacillas y se aplicó la disolución para que el canal central de la membrana resultase mojado con la disolución. Se detuvo la aplicación cuando pudo verse la disolución en la superficie externa de la membrana, lo que indicaba que todas las superficies de la membrana habían sido revestidas con la disolución. Se encerraron luego herméticamente las membranas en un tubo de hibridación y se incubó el conjunto a temperatura ambiental durante 15 minutos.

El anticuerpo no unido fue luego eliminado haciendo pasar aire a través del canal central de la membrana, lo que fue seguido del lavado del canal central con diversas aplicaciones de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,1% (~50 ml por aplicación). Las membranas revestidas fueron luego dejadas secar completamente.

50 Análisis de las membranas de fibra hueca

Para demostrar el efecto del pretratamiento con isopropanol sobre la fijación de anticuerpo a membranas de fibra hueca de polipropileno, se prepararon dos tubos (véase la Figura 3). Uno (Tubo A, 300) contenía una membrana 301 de fibra hueca de polipropileno que había sido empapada durante la noche en tampón de carbonato/bicarbonato antes de ser sumergida durante 60 minutos en anticuerpo porcino enlazado a peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase; Dako). El otro tubo (Tubo B, 310) contenía una membrana 311 de fibra hueca de polipropileno que había sido empapada durante la noche en isopropanol antes de ser sumergida durante 60 minutos en anticuerpo porcino enlazado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Dako). Ambas membranas, 301 y 311, fueron luego mantenidas en tampón que contenía Tween 20 al 0,1% y fueron lavadas a fondo.

Para determinar el grado de fijación del anticuerpo, se añadieron dos gotas de tetrametilbencidina (TMB), un reactivo cromogénico, a cada uno de dos viales de vidrio (no mostrados) que contenían 1,5 ml de sustrato de HRP, se sumergió cada una de las membranas 301 y 311 en cada uno de los viales y se dejó que se desarrollara un cambio de color indicativo de la presencia del anticuerpo.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Las manchas más oscuras de las membranas 301 y 311 indican un cambio de color causado por la HRP, es decir, la fijación de anticuerpos a la membrana. La membrana 311 es sustancialmente más oscura que la membrana 301, lo que indica que se fija sustancialmente más anticuerpo a ella.

Cuantificación de la unión

Para cuantificar la unión de microorganismos al anticuerpo fijado a las membranas de fibra hueca, se hace pasar una muestra de 100 ml que contiene una concentración conocida de *L. brevis* a través del dispositivo filtrante, se realiza un lavado utilizando PBS en Tween-20 al 0,1% (como antes) para eliminar los microorganismos no unidos, y se eluyen los microorganismos unidos utilizando un tampón (típicamente, ácido cítrico 0,1 M, pH de 3,0). Los microorganismos eluidos son luego sembrados en placas microbiológicas para determinar el nivel de captura.

Especificidad de la unión

Para mostrar la especificidad de la membrana, se aplica una disolución de 100 ml que contiene concentraciones conocidas de microorganismos mixtos al filtro y se sigue el procedimiento anterior. Sólo los microorganismos diana, es decir, *L. brevis*, son detectables tras la siembra microbiológica, habiendo sido eliminados por lavado todos los demás microorganismos de la membrana antes de la elución.

Dispositivos filtrantes

El dispositivo filtrante 100 comprende un orificio 20 de entrada de muestras que tiene un adaptador 21 de cierre Luer que se comunica con 35 membranas 30 de fibra hueca de polipropileno que tienen un diámetro medio de poro de 0,2 μ m. En el orificio 20 de entrada de muestras, los extremos primeros de las membranas 30 están embebidos en un adhesivo curable por luz UV que les mantiene en su sitio y les permite comunicarse con el orificio 20 de entrada de muestras. En el orificio 110 de salida, los extremos segundos de las membranas 30 están embebidos en un adhesivo curable por luz UV que les mantiene en su sitio y les permite comunicarse con el orificio 110 de salida, que está cerrado por el tapón 120, restringiéndose por ello el flujo a través de los extremos segundos de las membranas 30. Las membranas 30 han sido preparadas del modo descrito en la sección "Preparación de membranas de fibra hueca" anterior.

En uso, en la Etapa I, un volumen de 100 ml de cerveza rubia 60 es bombeado al dispositivo 100 por una bomba peristáltica 130, con un caudal de 100 ml/minuto, a través de un tubo 140 (el volumen de la muestra, tal como cerveza rubia, filtrado a través del dispositivo 100 puede ser aumentado hasta, por ejemplo, 1000 ml o más ajustando simplemente el área superficial de la membrana). Conforme el dispositivo 100 se llena de la cerveza rubia 60, el tapón 120 que bloquea el orificio 110 de salida causa que la única salida del dispositivo 100 sean los poros de las membranas 30 y, por lo tanto, la cerveza rubia 60 se filtra a través de las membranas 30 y el producto de filtración es recogido en el recipiente 150 de recogida de desechos y es descartado.

En la Etapa II, se quita el tapón 120 y, a través del tubo 140, se bombean 50 ml de un tampón 160 de lavado que consiste en disolución salina tamponada con fosfato que contiene Tween 20 al 0,01%, que pasan a lo largo del canal central de las membranas 30 (es decir, no a través de los poros de las membranas 30) y son recogidos en el recipiente 150 de desechos y son descartados. Una vez que se ha completado el paso del tampón 160 de lavado a través del dispositivo 100, se deja funcionando la bomba 130 durante 10 segundos adicionales con objeto de bombear aire a través del tubo 140 y las membranas 30 para eliminar el exceso de fluido de las membranas 30. Luego se apaga la bomba 140 y se separa el dispositivo 100 del tubo 140 y la bomba 130.

En la Etapa III, se fija luego una jeringa estéril de 1 ml de capacidad que contiene 0,5 ml de un tampón 161 de elución (tampón de lisis que consiste en NaOH 0,2 M) al orificio 20 de entrada de muestras y se aprieta completamente el émbolo 55 de la jeringa 50 para inundar las membranas 30 con el tampón 161 de elución. Se lleva luego hacia atrás el émbolo 55 y se hace retroceder el tampón 161 de elución a través del canal central de las membranas 30. Esto se repite dos veces más para asegurar que se han lisado todos los microorganismos unidos. Luego se aprieta completamente el émbolo 55 para expulsar el tampón 161 de elución en un tubo 170 estéril de 1,5 ml de capacidad.

En la Etapa IV, se añade un volumen igual de tampón neutralizante (Tris-fosfato 0,2 M) al tubo 170, se coloca una tapa sobre el tubo 170 y se mezcla su contenido invirtiendo el tubo 170 2-3 veces.

Finalmente, en la Etapa V, se lleva a cabo un ensayo de ATP sobre la muestra utilizando un luminómetro Biotrace Unilite y reactivos Sigma para bioluminiscencia.

Obviamente, se puede emplear una gran variedad de métodos para la detección de microorganismos, tales como PCR y siembra (como se describió anteriormente), y, de este modo, se pueden modificar las operaciones III-V según sea apropiado. Por ejemplo, la operación III de elución podría ser llevada a cabo utilizando ácido cítrico 0,1 M, pH de 3,0, para eluir los microorganismos completos sin lisis en el tubo 170.

Ensayos de ATP

El método más común y rápido para determinar una contaminación microbiana es la medición del ATP celular. Esto requiere la rotura de la membrana/pared celular (lisis celular) para liberar el ATP presente en la célula. El ATP liberado puede ser luego determinado utilizando una reacción enzimática que convierte un sustrato (luciferina) y ATP en diversos productos generando luz. La cantidad de luz puede ser luego medida utilizando un luminómetro estándar. Se dispone comercialmente de diversos ensayos de ATP. Sin embargo, la capacidad para lisar hasta compleción y, por lo tanto, liberar todo el ATP celular depende de la cepa del microorganismo.

ES 2 287 254 T3

Construcción de dispositivos para filtración como los ilustrados por el segundo dispositivo para filtración (Figura 2)

Aparato

1. Membranas de fibra hueca de polipropileno que tienen un diámetro medio de poro de $0,2\ \mu\text{m}$ (pretratadas con Tween 20 al 5%).
2. Controlador semiautomático Loctite (RTM) 21 que lleva incorporado un aplicador de mano y un conmutador de pedal, con presión ajustada a 20 kPa y salida digital a 35,0.
3. Fuente de luz UV Bondmatic 850, con temporizador ajustado a 40 segundos.
4. Collares (Figura 2, 200) (varilla de policarbonato) que tienen un diámetro interno de 7,0 mm y un diámetro externo de 12,4 mm.
5. Tapas terminales en forma de Y (Figura 2, 210) hechas de polímero de polipropileno de 2 mm, que tienen un extremo ancho (diámetro interno de 12,4 mm) para recibir collares y un extremo estrecho (diámetro interno de 4,1 mm) para conexión con la cánula de la jeringa Luer.

Se prepararon dispositivos para filtración del modo siguiente:

1. Se limpian todas las superficies de trabajo con alcohol isopropílico (IPA; del inglés, *isopropyl alcohol*).
2. Se toma un haz que consiste en un número apropiado de tramos de las membranas de fibra hueca de polipropileno y se pone una pluralidad de collares alrededor del haz.
3. En una posición situada a aproximadamente 30 mm del extremo del haz de membranas de fibra hueca, se pone la boquilla del aplicador de adhesivo en el centro del haz de membranas y se aplica adhesivo de modo que penetre a través del haz de membranas y se manipula la boquilla para que se aplique adhesivo a todas las membranas de la zona. Se aplica adicionalmente adhesivo al exterior del haz en dicha posición. Luego se desliza un collar y se le hace girar sobre las membranas en dicha posición para que entre en contacto con el adhesivo.
4. Se pone la sección del haz que está cubierta de adhesivo bajo la fuente de luz UV para curar el adhesivo.
5. Se aplica adhesivo del modo detallado en la operación 3 (anterior) a lo largo del haz, en una posición situada a aproximadamente 30 mm del collar previo. Se deslizan y se hacen girar sobre el adhesivo un primer collar y luego un segundo collar de modo que estén en contacto entre sí y luego se les separa 1-2 mm y se repite la operación 4.
6. Se repite la operación 5 hasta que la totalidad del tramo de membranas tenga collares en su sitio.
7. Se cortan las fibras por el espacio de 1-2 mm situado entre los pares de collares para obtener una pluralidad de dispositivos de fibra hueca, fibras que tienen canales centrales despejados en cada extremo y que están selladas con un collar en el exterior de cada extremo.
8. Tomando uno de los dispositivos y un par de tapas terminales, se aplica una imprimación Loctite 770 al borde interno de las tapas terminales y alrededor del exterior de los collares del dispositivo. Se deja reposar el conjunto durante aproximadamente 1 minuto y luego se aplica el adhesivo de endurecimiento rápido Loctite 403 alrededor del exterior de cada collar y se aprietan firmemente las tapas terminales sobre los collares hasta que quedan fijadas.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos al usar los dispositivos y métodos del presente invento muestran que es posible llevar a cabo una detección sencilla, rápida y precisa de un pequeño número de microorganismos a partir de un gran volumen de líquido de muestra.

Como se muestra en la Figura 4, el dispositivo filtrante 500 comprende 20 membranas 510 de polipropileno de fibra hueca, de 40 mm de longitud, contenidas en un cuerpo filtrante 520; cada una de las membranas 510 está aislada en una acanaladura del cuerpo 520 y se mantiene en su sitio por cada extremo mediante un adhesivo 530 que se pone en el exterior de las membranas 510 y que no entra en el canal central ni en los extremos de las membranas 510. La tapa terminal 540 de ajuste rápido tiene un conector para el tubo 541, para que las muestras puedan ser alimentadas directamente al dispositivo 500 desde depósitos de muestras. La tapa terminal 550 de ajuste rápido comprende una tapa sellada con lámina metálica fina que tiene un conector para tubos (no mostrado), y, cuando el sello de lámina metálica fina está intacto, significa que la única vía para que salga fluido del dispositivo 500 es por filtración a través de las membranas 510. Tras la perforación del sello de hoja metálica fina mediante, por ejemplo, una jeringa 551, puede tener lugar flujo de manera distinta que por filtración, lo que significa que los microorganismos no unidos a los anticuerpos fijados a las membranas 510 pueden ser eliminados por lavado.

El cuerpo externo 520 del dispositivo 500 también comprende una abertura 560 a la cual puede fijarse un dispositivo de vacío para potenciar adicionalmente la filtración a través de las membranas 510.

Con objeto de simplificar las anteriores operaciones de aplicación de adhesivo a las membranas de fibra hueca, en lugar de utilizarse un adhesivo curable por luz UV y un aplicador (por ejemplo, una jeringa), lo que requiere una puesta en contacto con las membranas y podría dar lugar a contaminación, una alternativa es utilizar una combinación de un pegamento (tal como una resina epoxídica) y una centrífuga. En resumen, se puede poner un haz de membranas de fibra hueca en un recipiente junto con una resina epoxídica y se puede centrifugar el conjunto (por ejemplo, 750 rpm) con objeto de causar que la resina epoxídica forme un sello alrededor de un solo extremo del haz de membranas de fibra hueca, continuándose la centrifugación hasta que la resina se haya endurecido.

Se puede invertir luego el haz de membranas y repetir el proceso con objeto de sellar el otro extremo de las membranas. Se puede llevar a cabo la curación adicional del adhesivo mediante, por ejemplo, cocción. Con objeto de evitar que los adhesivos y las membranas lleguen a pegarse a, por ejemplo, la centrífuga, las partes pueden ser pretratadas mediante limpieza con un agente de desprendimiento tal como Promol K502.

Los extremos sellados de las membranas pueden ser luego cortados por los tapones de resina epoxídica con objeto de obtener un haz de membranas de fibra hueca no bloqueadas que terminan en cada extremo con un tapón de resina epoxídica. Estos haces pueden ser luego empleados de la misma manera que los haces hechos al usar un adhesivo curable por luz UV.

Pur System Adhesive 725A y Pur System Adhesive 725BF son ejemplos de resinas epoxídicas útiles.

25 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aun cuando se ha tenido mucho cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores ni omisiones, y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

30 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0111006 A (párrafo 3)
- 35 • WO 0023792 A (párrafo 4)
- DE 19814715 (párrafo 5)
- WO 9804675 A (párrafo 6)
- 40 • EP 0439121 A (párrafo 7)
- WO 0111006 A (párrafo 9)
- 45 • GB 2135902 A (párrafo 39)
- EP 302949 A (párrafo 39)
- WO 9400222 A (párrafo 39)
- 50 • WO 8400015 A (párrafo 39)
- US 5863501 A (párrafo 39)
- 55 • US 5814179 A (párrafo 39)
- US 4501793 A (párrafo 39)
- JP 4135478 A (párrafo 39)
- 60 • JP 63104615 A (párrafos 39 y 40)
- JP 63088007 A (párrafo 39)
- 65 • JP 61133105 A (párrafo 39)

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- M. J. MCPHERSON *et al.*, “PCR: A practical approach”. *Oxford University Press* (párrafo 54)
- 5 • J. SAMBROOK *et al.*, “Molecular cloning: A laboratory manual”. *Cold Spring Harbour Laboratory*, 1989 (párrafo 54)
- HUYNH y DAVIES, “DNA Cloning, Vol. I - A Practical Approach”. *IRL Press*, 1985 (párrafo 54)
- 10 • F. SANGER *et al.*, *PNAS*, 1977, vol. 74 (12), 5463-5467 (párrafo 54)
- E. HARLOW y D. LANE, “Using Antibodies: A Laboratory Manual”. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1998 (párrafo 54)
- 15 • G. JUNG y A. G. BECK-SICKINGER, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1992, vol. 31, 367-486 (párrafo 54)
- M. A. HARRIS e I. F. RAE, “General Techniques of Cell Culture”. *Cambridge University Press*, 1997 (párrafo 54)
- 20 • “Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual”. *Academic Press Inc.*, 1996 (párrafo 54)
- T. YASUI y K. YODA, PMID: 9361439. *Appl. Environ. Microbiol.*, Noviembre de 1997, vol. 63 (11), 4528-33 (párrafo 57)
- 25 • T. YASUI y K. YODA, PMID: 9228750. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15 de Junio de 1997, vol. 151 (2), 169-76 (párrafo 57)
- H. SHIMOHASHI, S. KODAIRA y N. SUEGARA. PMID: 62862. *Jpn. J. Microbiol.*, Octubre de 1976, vol. 20 (5), 405-13 (párrafo 57)
- 30 • YUICHI TSUCHIYA, YASUKAZU NAKAKITA, JUNJI WATARI y KEN SHINOTSUKA. *American Society of Brewing Chemists* (ASBC, 19 de Junio de 1999) (párrafo 57).

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra fluida, que comprende las operaciones de:

- i) hacer pasar dicha muestra a través del orificio de entrada de muestras de un dispositivo filtrante que comprende una pluralidad de membranas filtrantes de fibra hueca a las que está fijado un miembro primero de una pareja de unión específica, en que dicho microorganismo presenta el miembro segundo de dicha pareja de unión específica, en que dichas membranas tienen unos extremos primero y segundo, una superficie externa y una superficie interna que define un canal central, en que dicho extremo primero de cada una de dichas membranas está abierto y se comunica con dicho orificio de entrada de muestras y en que el flujo a través de dicho extremo segundo de cada una de dichas membranas está limitado para que dicho flujo se produzca sólo a través de dicho extremo primero y los poros de dichas membranas, y en que la mezcla de muestra se filtra a través de los poros de dichas membranas para dejar un producto de filtración en dicho canal central de dichas membranas;
- ii) separar por lavado la parte no unida de dicho producto de filtración procedente de dicho canal central de dichas membranas;
- iii) detectar la presencia de cualquiera de dichas parejas de unión específicas fijada a dichas membranas; y
- iv) correlacionar los resultados de la operación (iii) de detección con la presencia de dicho microorganismo en dicha muestra fluida;

en el que dichas membranas han sido tratadas con al menos un agente del grupo que consiste en un agente humectante y un agente detergente antes de que dicho miembro primero de dicha pareja de unión específica se fije a ellas.

2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicha muestra tiene un volumen de al menos 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900 ó 1000 ml.

3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 2, en que dicho miembro primero de una pareja de unión específica es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une al antígeno.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichas membranas son seleccionadas del grupo que consiste en membranas de polipropileno, polisulfona, acetato de celulosa y nailon.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que, antes de la operación (i), comprende además las operaciones de:

- a) hacer pasar una muestra gaseosa a través de un dispositivo para filtración de gases que comprende un filtro para gases; y
- b) poner dicho filtro de dicho dispositivo para filtración de gases en contacto con un fluido de muestras para suspender o solubilizar cualesquiera de dichos microorganismos retenidos en dicho filtro, para producir una muestra fluida.

6. Un método para analizar el contenido de un envase en cuanto a la presencia de un microorganismo dado, que comprende las operaciones de:

- a) poner dicho envase en una primera cámara que se comunica, por medio de un elemento perforador, con una segunda cámara que contiene un fluido de muestras;
- b) poner dicho envase en contacto con dicho elemento perforador para que toda materia sólida de dicho envase pueda pasar a dicho fluido de muestras de dicha segunda cámara a través de dicho elemento perforador, para obtener una muestra fluida; y
- c) llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 sobre dicha muestra fluida.

7. Un método de acuerdo con la Reivindicación 6, que comprende además la operación de efectuar un cambio de la presión gaseosa relativa en dichas cámaras primera y segunda para que la presión en dicha primera cámara sea mayor que la presión en dicha segunda cámara.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 6 y 7, en que dicho envase está provisto de una almohadilla autoselladora, almohadilla autoselladora que entra en contacto con dicho elemento perforador.

9. Un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra sólida, que comprende las operaciones de:

ES 2 287 254 T3

a) poner dicha muestra sólida en contacto con un fluido de muestras de modo que dicho microorganismo quede en fase fluida, para obtener una muestra fluida; y

b) llevar a cabo el método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 sobre dicha muestra fluida.

5

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la operación (iii) de detección es seleccionada del grupo que consiste en un ensayo de inmunoabsorción con enzimas, detección de un radiomarcador, detección de fluorescencia, un ensayo de ATP, siembra y PCR.

10 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichas membranas están revestidas con los miembros primeros de una pluralidad de parejas de unión específicas.

12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichas membranas son tratadas con isopropanol antes de que se fije a ellas dicho miembro primero de dicha pareja de unión específica.

15

13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichas membranas son tratadas con Tween-20 antes de que se fije a ellas dicho miembro primero de dicha pareja de unión específica.

20 14. Un dispositivo que tiene un orificio de entrada de muestras y una pluralidad de membranas filtrantes de fibra hueca a las que está fijado un miembro primero de una pareja de unión específica, en que un microorganismo dado presenta el miembro segundo de dicha pareja de unión específica, en que dichas membranas tienen unos extremos primero y segundo, una superficie externa y una superficie interna que define un canal central, en que dicho extremo primero de cada una de dichas membranas está abierto y se comunica con dicho orificio de entrada de muestras y en que el flujo a través de dicho extremo segundo de cada una de dichas membranas está limitado para que dicho flujo
25 se produzca sólo a través de dicho extremo primero y los poros de dichas membranas, de modo que una mezcla de muestra que entra en dicho dispositivo a través de dicho orificio de entrada de muestras se filtra a través de los poros de dichas membranas para dejar un producto de filtración en dicho canal central de dichas membranas, y en que dichas membranas han sido tratadas con al menos un agente del grupo que consiste en un agente humectante y un agente detergente antes de que dicho miembro primero de dicha pareja de unión específica se fije a ellas.

30

35

40

45

50

55

60

65

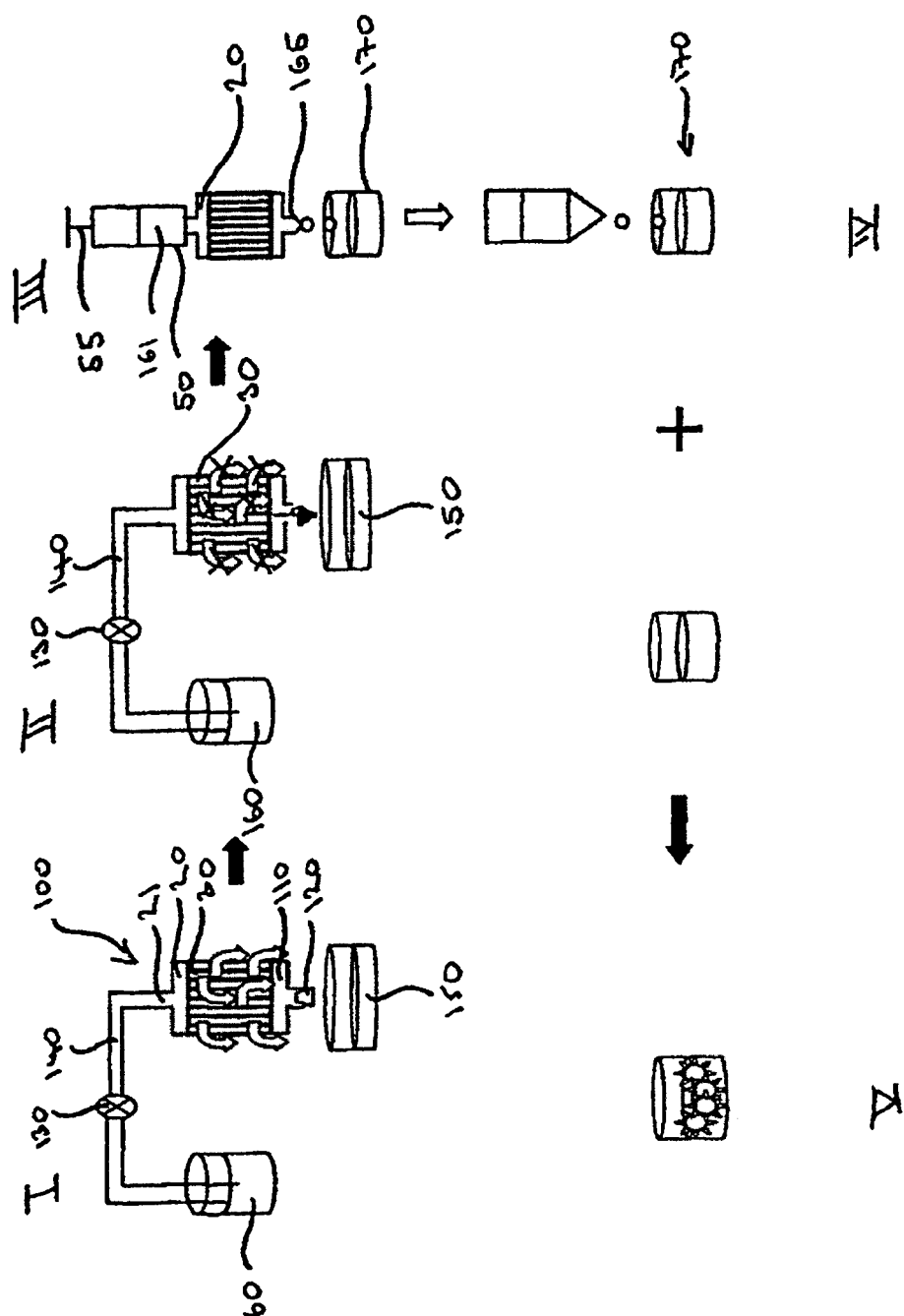


Figura 1

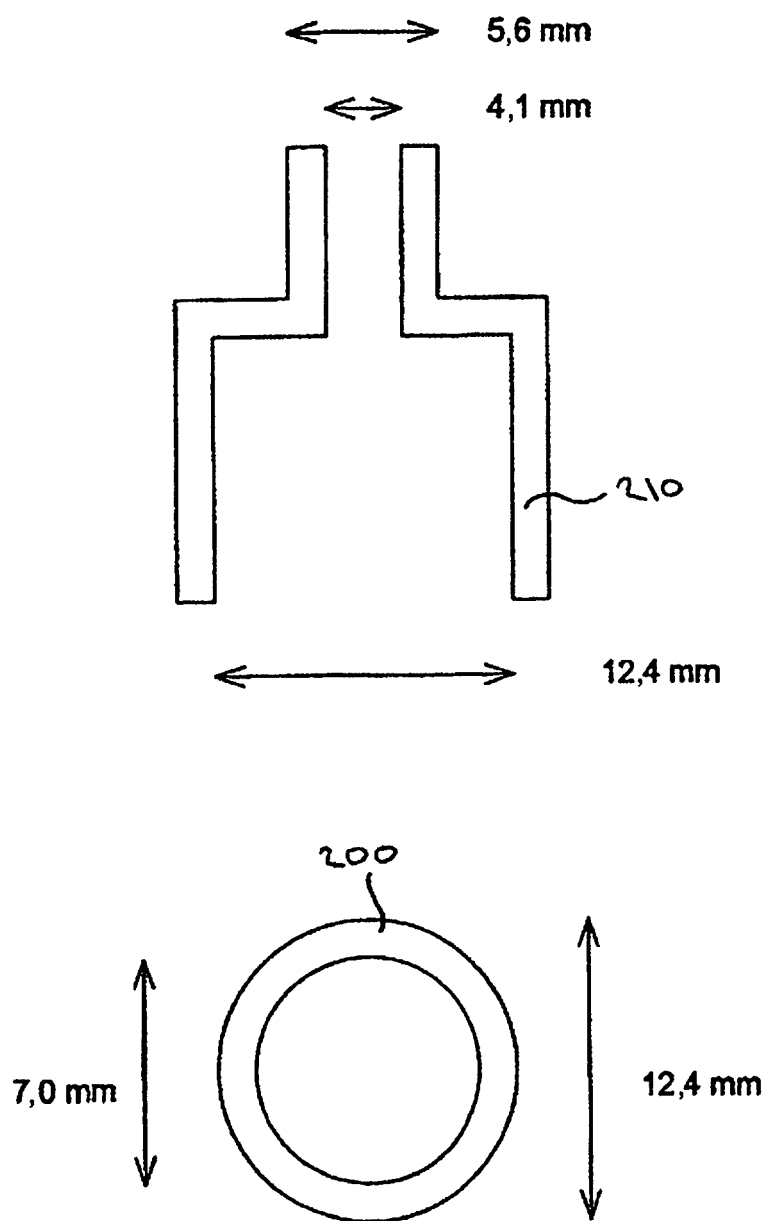


Figura 2

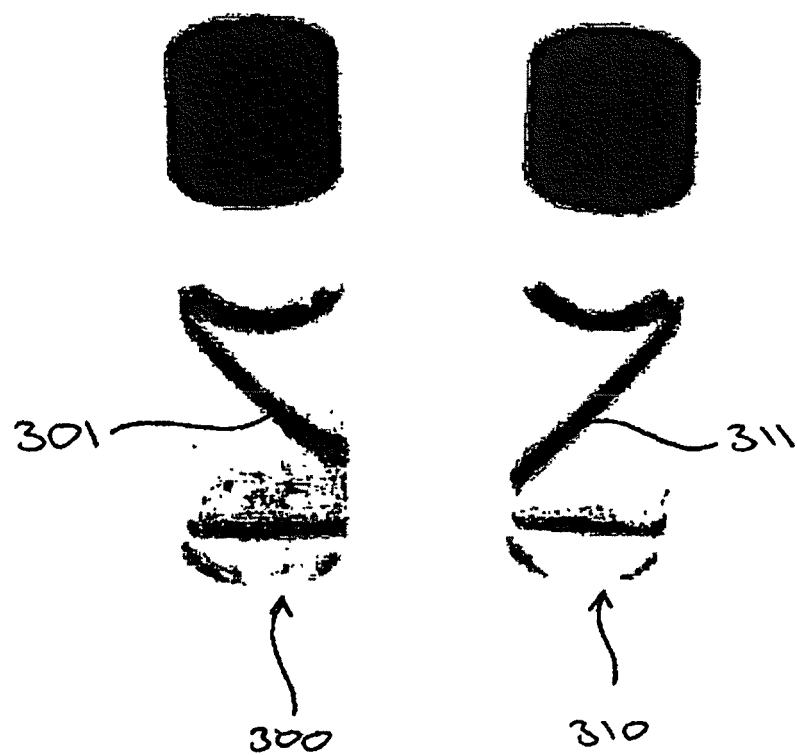


Figura 3

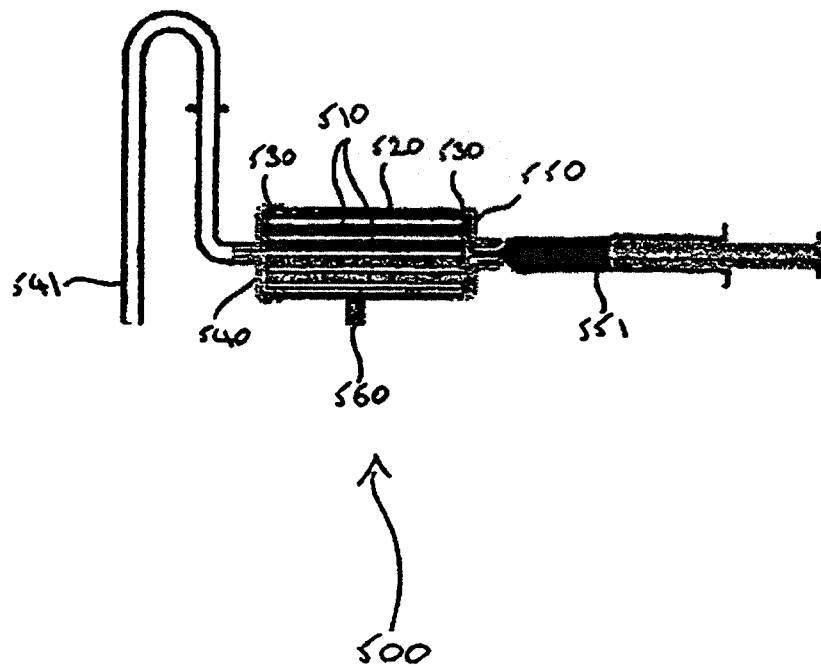


Figura 4