



CONFEDERAZIONE SVIZZERA  
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑤ Int. Cl.<sup>2</sup>: G 01 N 33/16  
B 01 L 3/14  
B 65 D 81/32



⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

615 511

⑲ Numero della domanda: 5070/77

⑳ Data di deposito: 20.04.1977

㉔ Brevetto rilasciato il: 31.01.1980

④⑤ Fascicolo del  
brevetto pubblicato il: 31.01.1980

⑦③ Titolare/Titolari:  
J. K. and Susie L. Wadley Research Institute and  
Blood Bank, Dallas County/TX (US)

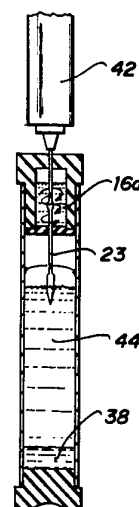
⑦② Inventore/Inventori:  
Gordon Lee Dorn, Dallas/TX (US)  
Joseph MacGlashan Hill, Dallas/TX (US)

⑦④ Mandatario:  
Patentanwälte Racheli & Fiammenghi, Lugano

⑤④ Apparecchio mescolatore di una dose di fluido campione con un liquido di trattamento.

⑤⑦ L'apparecchio è utilizzato principalmente per rivelare rapidamente la presenza di microorganismi nel sangue determinandone la specie e la quantità. Consta di un recipiente allungato chiuso da due chiusure perforabili dall'ago (23) di una siringa (42). Una prima chiusura (16) è provvista di una membrana pure perforabile che delimita una camera secondaria (16a) contenente un fluido per il trattamento del campione (44,38). L'ago (23) presenta fori che mettono in comunicazione la camera secondaria (16a) con quella principale contenente la miscela (44) del campione col liquido di trattamento. Detta miscela (44) è posta a contatto con un liquido filtrante sterile (38) avente densità maggiore di quella della miscela (44) e capace di ricevere selettivamente microbi patogeni da detta miscela.

L'agente di trattamento (20) contenuto nella camera secondaria (16a) viene mescolato al campione tramite l'ago (23) della siringa.



## RIVENDICAZIONI

1. Apparecchio mescolatore di una dose di fluido campione con un liquido di trattamento, caratterizzato da:

a) un recipiente (12) avente una prima e una seconda estremità, chiuse a tenuta; almeno una estremità essendo chiusa a tenuta da un primo mezzo perforabile (16) così da delimitare una camera principale (40) atta ad accogliere il campione mescolato con un fluido di trattamento (44), la quale camera principale (40) viene mantenuta ad una pressione minore di quella atmosferica e una camera secondaria (16a); detta camera secondaria (16a) atta a contenere un fluido di trattamento (20) del campione suddetto, essendo compresa fra detto primo mezzo perforabile (16) ed una membrana (22) perforabile in modo tale che uno stiletto (23) possa passare attraverso detto primo mezzo perforabile (16) e detta membrana sino a raggiungere detta camera principale (40);

b) uno stiletto di perforazione (23) atto a passare attraverso detto primo mezzo di chiusura perforabile (16) attraverso detta camera secondaria (16a) e attraverso detta membrana perforabile (22) e atto a permettere contemporaneamente di mescolare il fluido campione col fluido di trattamento (20) e di passare la miscela (44) in detta camera principale (40), depositandola su un mezzo filtrante (38).

2. Apparecchio secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da ciò che anche l'altra estremità del recipiente è chiusa a tenuta da un secondo mezzo perforabile (14), a superficie interna piana (18).

3. Apparecchio secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato da ciò che lo stiletto (23) (figg. 9 e 10) di una siringa, comprende:

c) una prima apertura (24) ed una seconda apertura (26) distanziate longitudinalmente lungo la parete di detto stiletto in maniera tale che tanto la prima che la seconda apertura comunichino ambedue con la camera secondaria (16a) dopo la penetrazione dello stiletto entro detto primo mezzo di chiusura perforabile;

d) un mezzo (28) per bloccare il flusso del fluido campione attraverso detto stiletto, mezzo predisposto tra la prima (24) e la seconda (26) apertura.

4. Apparecchio secondo le rivendicazioni 1, 2 e 3, caratterizzato da ciò che la punta (34) di detto stiletto viene chiusa a tenuta essendo le pareti laterali dello stiletto schiacciate in corrispondenza della sua punta, mentre la parete di detto stiletto adiacente a detta punta schiacciata porta una apertura passante (30).

5. Apparecchio secondo le rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato da ciò che detta apertura passante è formata da due aperture coassiali (30) disposte nella parete dello stiletto adiacente a detta punta (34).

6. Apparecchio secondo le rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato da ciò che detto mezzo di bloccaggio (28) comprende pareti laterali schiacciate (28) di detto stiletto tra detta prima apertura (24) e detta seconda apertura (26).

7. Apparecchio secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato da ciò che comprende un ulteriore stiletto (35) (fig. 11) di una siringa presentante un'apertura (36), essendo detta apertura distanziata longitudinalmente lungo la parete di detto stiletto, in modo tale che dopo l'iniezione dello stiletto attraverso detto secondo mezzo di chiusura perforabile (14) (fig. 7), essa (36) risulti adiacente alla faccia interna (18) di detto secondo mezzo di chiusura (14) perforabile.

8. Apparecchio secondo le rivendicazioni da 1 a 7, caratterizzato da ciò che detto recipiente (12) è realizzato in una forma allungata (10) (fig. 2) ed è fissabile a mezzi che consentono di centrifugare la miscela (44) del campione col fluido di trattamento contenuta nella camera principale (40).

9. Utilizzazione dell'apparecchio secondo le rivendicazioni da 1 a 8 per l'isolamento e la concentrazione di microbi pa-

togeni da un campione di sangue, caratterizzata da ciò che la miscela (44) del campione col fluido di trattamento viene posta a contatto con un mezzo liquido filtrante sterile (38), che non è tossico per detti microbi patogeni ed ha una densità maggiore di 1,06 gm/cc (44) ma è capace di ricevere selettivamente microbi patogeni da detto campione; un agente di trattamento (20) essendo disposto entro detta camera secondaria (16a) e detto stiletto di iniezione (23) essendo fatto passare attraverso detto primo mezzo di chiusura perforabile (16), attraverso detta camera secondaria (16a) contenente l'agente di trattamento (20) e attraverso detta membrana perforabile (22) per mescolare detto campione con detto agente di trattamento (20) nel momento in cui detto fluido campione passa attraverso di esso, e per iniettare la miscela (44) in detto spazio sotto vuoto (40).

10. Utilizzazione secondo la rivendicazione 9, caratterizzata da ciò che detto mezzo filtrante liquido (38) è una soluzione acquosa di un soluto macromolecolare avente aperture microporose attraverso la sua rete solubilizzata dette aperture avendo dimensioni sufficienti per far passare selettivamente detti microbi patogeni da detto fluido campione.

La presente invenzione si riferisce ad un apparecchio per mescolare una dose di fluido campione con un liquido di trattamento, apparecchio particolarmente atto ad essere usato per test di laboratorio allo scopo di rivelare la presenza di microbi patogeni.

Uno dei tipi più gravi di infezioni del sangue che si conoscono oggi è la setticemia che è la presenza di microorganismi nel sangue. La percentuale di mortalità dei pazienti affetti da setticemia è circa del 25%. Inoltre quando alla setticemia subentra anche lo shock la mortalità aumenta ad un'impressionante 60%. I pazienti particolarmente suscettibili di contrarre la setticemia sono quelli che soffrono di malattie debilitanti, che hanno subito gravi operazioni o ricevono medicamenti immunosoppressivi o anti-cancro.

Poiché la setticemia può causare un rapido peggioramento delle condizioni di un paziente è assolutamente necessario effettuare una diagnosi ed iniziare il necessario trattamento al più presto possibile. È importante non solo che il medico venga subito a sapere con certezza che il paziente ha contratto la setticemia ma anche che egli possa identificare facilmente e rapidamente i particolari microorganismi che causano l'infezione. Quindi, un metodo rapido ed efficiente per analizzare quantitativamente il sangue del paziente è il primo requisito per poter trattare la malattia.

Il metodo e l'apparecchio convenzionale utilizzati a tutt'oggi per rivelare la presenza di microorganismi nel sangue presentano uno o più notevoli svantaggi. Tra questi: è necessario parecchio tempo per rilevare la presenza dei microorganismi, sussiste l'impossibilità di distinguere tra i diversi tipi di microbi patogeni nel campione di sangue ed inoltre molti di questi metodi non consentono di ottenere informazioni quantitative. Un ulteriore inconveniente sta nel rischio di contaminazione da parte dell'ambiente o del personale del laboratorio.

Recentemente si è sviluppato un metodo perfezionato per rivelare la presenza di microbi, metodo che è estremamente rapido e quantitativo e minimizza la contaminazione del campione da parte dell'ambiente o del personale di laboratorio. Questo metodo è descritto nel brevetto USA N. 3 928 139 rilasciato il 23 dicembre 1975 e avente come titolo: «Rivelazione di microbi patogeni».

Secondo questo metodo perfezionato atto a rivelare la presenza di microbi patogeni, un campione di fluido corporeo ad es. di sangue (preferibilmente un campione di sangue lisato)

viene depositato su di un mezzo filtrante liquido entro la zona sterile delimitata. Il mezzo filtrante liquido presenta una densità maggiore di quella del campione fluido e comprende una soluzione acquosa sterile che è atta ad accogliere microbi patogeni provenienti dal campione fluido. Dopo il ciò la zona sterile delimitata è sottoposta a centrifugazione così da spingere a forza il campione fluido contro il mezzo filtrante liquido e far sì che i microbi patogeni passino entro di esso selettivamente separandosi così dalla massa del campione fluido. Successivamente il mezzo filtrante liquido contenente i microbi patogeni viene separato dal resto del campione fluido e parti del mezzo filtrante liquido vengono messe a cultura. Tipi perfezionati di apparecchi per eseguire questo nuovo metodo sono descritti nel brevetto USA N. 3 875 012 rilasciato il 1 aprile 1975 col titolo: «Apparecchio e metodo per rivelare microbi patogeni» e nella domanda di brevetto dello stesso richiedente portante il N. 535 148, depositata il 20 dicembre 1974 e avente come titolo: «Dispositivo mescolatore e centrifugatore».

L'apparecchio secondo la presente invenzione elimina gli inconvenienti propri degli apparecchi noti sopra elencati e permette una grande rapidità e sicurezza nella determinazione qualitativa e quantitativa dei microorganismi nel sangue. Esso è caratterizzato da:

a) un recipiente avente una prima e una seconda estremità, chiuse a tenuta; almeno un'estremità essendo chiusa a tenuta da un primo mezzo perforabile così da delimitare una camera principale atta ad accogliere il campione, la quale camera principale viene mantenuta ad una pressione minore di quella atmosferica e una camera secondaria; detta camera secondaria atta a contenere un fluido di trattamento del campione suddetto, essendo compresa fra detto primo mezzo perforabile ed una membrana perforabile in modo tale che uno stiletto possa passare attraverso detto primo mezzo perforabile e detta membrana sino a raggiungere detta camera principale;

b) uno stiletto di perforazione atto a passare attraverso detto primo mezzo di chiusura perforabile e attraverso detta membrana perforabile e atto a permettere il passaggio del campione in detta camera principale e a mescolare il campione con detto fluido di trattamento mentre detto campione passa attraverso di esso.

Secondo una preferita forma di realizzazione, anche l'altra estremità del recipiente è chiusa da un secondo mezzo perforabile, a superficie interna piana.

La presente invenzione potrà essere compresa più facilmente da un esame dei disegni annessi in cui:

fig. 1 è una sezione di una forma preferita d'esecuzione di un dispositivo mescolatore secondo la presente invenzione;

figg. 2 a 8 sono illustrazioni schematiche di un procedimento atto a rivelare la presenza di microbi patogeni utilizzando il dispositivo di fig. 1;

figg. 9 e 10 sono due viste del nuovo stiletto utilizzato per iniettare un campione nel dispositivo e

fig. 11 è una vista dello stiletto utilizzato per asportare e separare una parte del mezzo filtrante liquido contenuto nel recipiente.

Il dispositivo mescolatore 10 secondo la presente invenzione è illustrato in sezione in fig. 1 ed è utilizzato in combinazione con un nuovo stiletto del tipo rappresentato in fig. 9. Come illustrato, il dispositivo mescolatore 10 comprende un recipiente di centrifugazione tubolare di forma allungata munito di un primo elemento di chiusura perforabile 16 che chiude a tenuta la parte superiore del recipiente e da un secondo elemento di chiusura perforabile 14 che chiude la parte inferiore di detto recipiente.

Il recipiente di centrifugazione 12 può essere fatto di vetro o plastica dura ad es. policarbonato o polipropilene. Gli elementi di chiusura perforabili 16 e 14 possono essere costituiti da tappi di gomma ad auto-tenuta. L'elemento di chiusura 14

presenta una superficie interna piana 18 essenzialmente ad angolo retto con la parete del recipiente di centrifugazione. Si è visto che questa superficie interna piana serve egregiamente a prevenire la sedimentazione di microbi patogeni, sedimentazione che ha luogo invece sul bordo interno rivolto verso l'alto degli elementi di chiusura di tipo convenzionale. Inoltre, la superficie interna piana consente di osservare chiaramente la miscela mezzo filtrante-campione durante gli stadi di separazione dell'esperimento o test per microbi patogeni che verrà discusso in quel che segue.

La camera 16a del fluido di trattamento è racchiusa entro l'elemento di chiusura perforabile 16 e contiene un fluido di trattamento 20 del campione. La camera del fluido di trattamento è ricavata incollando mediante adesivo in corrispondenza delle regioni 22a un tappo o membrana terminale 22 all'estremità aperta di un elemento di chiusura tubolare cavo. La membrana terminale 22 non si rompe né si stacca al passaggio attraverso di essa di uno stiletto. Ne consegue che la camera del fluido di trattamento 16a si mantiene strutturalmente intatta dopo detto passaggio. Dunque, la miscelazione del fluido di trattamento col campione non avviene e non capita che ambedue i fluidi penetrino assieme nello spazio vuoto 40. Al contrario, si utilizzerà, come descritto in seguito, un unico stiletto per mescolare intimamente tra di loro i fluidi entro la camera del fluido di trattamento e/o la cannula dello stiletto.

Come rappresentato, la camera del fluido di trattamento è disposta generalmente in posizione centrale entro l'elemento di chiusura perforabile 16 ed è in genere di forma cilindrica. Tuttavia essa potrà anche essere di qualsiasi forma e volume convenienti a seconda del fluido di trattamento del campione che verrà utilizzato. Inoltre non è obbligatorio che sia disposta nel centro ma potrà trovarsi in qualsiasi altro punto opportuno purché un ago di iniezione possa passare attraverso di essa e comunicare con lo spazio vuoto del recipiente di centrifugazione. È preferibile che il fluido di trattamento del campione venga iniettato mediante una comune siringa entro la camera di trattamento e precisamente attraverso la superficie laterale dell'elemento di chiusura a pressione 16. Dopo essere stato iniettato in questo modo e dopo che l'elemento di chiusura perforabile 16 sia stato posizionato sull'estremità del recipiente di centrifugazione 12 il fluido di trattamento del campione non potrà fuoriuscire dalla camera di trattamento in quanto il foro praticato dalla siringa risulta coperto dalla parete del recipiente tubolare di vetro. Alternativamente, il fluido di trattamento del campione può essere depositato nella camera di trattamento prima che il tappo (o membrana) terminale 22 sia incollato all'elemento di chiusura perforabile 16 in corrispondenza delle regioni 22a.

Figg. 9 e 10 illustrano due viste della forma d'esecuzione preferita dello stiletto 23 dell'apparecchio utilizzato per iniettare il campione nel recipiente di centrifugazione. Questo stiletto preferito comprende almeno due aperture 24 e 26 disposte longitudinalmente sulla sua parete e a distanza tale che, dopo l'iniezione, ambedue dette aperture vengano a trovarsi entro la camera di trattamento 16a. Inoltre si prevede un mezzo di blocco 28 ad es. un restringimento disposto tra dette due aperture 24 e 26 per impedire che nella cannula dello stiletto dette aperture comunichino tra di loro. In questo modo il campione iniettato potrà essere spinto a forza ad uscire dall'apertura 24 e ad entrare nella camera del fluido di trattamento 16a. L'apertura 26 sotto al mezzo di blocco 28 si trova in comunicazione, tramite il foro 30, con lo spazio sotto vuoto 40 del recipiente di centrifugazione tramite la cannula dello stiletto. Ne risulta che al momento in cui si inietta il campione nella camera 16a, quest'ultimo è spinto ad uscire dallo stiletto 23 attraverso l'apertura 24 e ad entrare nella camera del fluido di trattamento 16a. La turbolenza che ne risulta in detta camera provoca e favorisce una intensa miscelazione del campione col li-

quido di trattamento 20. La miscela fluido di trattamento-campione rientra poi nello stiletto attraverso la seconda apertura 26 che si trova anch'essa entro la camera del fluido di trattamento e, dal vuoto dello spazio 40 del recipiente di centrifugazione viene aspirata, attraverso la parte inferiore della cannula dello stiletto, fuoriuscendo dalle aperture 30 adiacenti all'estremità di detto stiletto e viene infine depositata su un mezzo filtrante 38.

Si potranno usare una pluralità di aperture sia sopra detto mezzo di blocco 28 che sotto o in ambedue le posizioni. Il mezzo di blocco può essere a forma di tappo previsto entro la cannula dello stiletto oppure, come rappresentato nelle figg. 9 e 10, il blocco tra le aperture nella cannula sarà realizzato mediante restringimento delle pareti dello stiletto in quel punto. La punta dello stiletto può essere una qualsiasi punta di siringa. Tuttavia si preferirà una punta appiattita 32 a forma di spada con due aperture 30 direttamente sopra di essa così da contribuire alla distribuzione uniforme della miscela fluido di trattamento-campione entro lo spazio vuoto del recipiente di centrifugazione 12.

Si è visto che per ottenere una miscelazione intima e completa non è necessariamente richiesto di prevedere due aperture separate da un mezzo di blocco. Potrà bastare un'apertura disposta longitudinalmente lungo la parete dello stiletto così che dopo che è avvenuta l'iniezione possa comunicare con la camera del fluido di trattamento. Dopo aver iniettato un campione attraverso l'apertura che si trova nella camera del fluido di trattamento si aspira entro la cannula stiletto detto fluido di trattamento che si mescolerà intimamente con il campione che già si trova in detta cannula. La miscela fluido di trattamento campione viene poi depositata nello spazio sotto vuoto 40 del recipiente di centrifugazione 12.

La fig. 11 mostra un nuovo tipo di stiletto 35 che viene utilizzato per asportare un sottile strato di fluido adiacente alla superficie interna piana 18 del secondo elemento di chiusura perforabile 14. Lo stiletto 35 può presentare una lunghezza qualsiasi purché sufficiente a forare detto secondo elemento di chiusura 14. Le caratteristiche che lo distinguono consistono in ciò che la punta 34 dello stiletto 35 è chiusa e si prevede almeno un'apertura 36 distanziata longitudinalmente lungo la parete dello stiletto in modo che, dopo aver iniettato lo stiletto completamente attraverso detto secondo elemento di chiusura 14, la o le aperture 36 vengano a trovarsi leggermente al di sopra della superficie interna piana 18 del detto secondo elemento di chiusura 14. Nella forma preferita di fig. 11 la punta 34 dello stiletto 35 è stata appiattita per chiuderla a tenuta e le aperture coassiali 36 sono posizionate una di fronte all'altra attraverso la parete dello stiletto 35. Come è ovvio, la distanza longitudinale dalle aperture alla base dello stiletto dovrebbe essere leggermente maggiore dello spessore del secondo elemento di chiusura 14. La lunghezza dello stiletto dalle aperture 36 alla sua punta 34 può essere scelta a piacere secondo la convenienza. Per il fatto che le aperture 36 sono molto vicine alla superficie interna piana del secondo mezzo di chiusura perforabile, sarà possibile asportare simultaneamente da detta superficie e attraverso dette aperture 36 parti, genericamente uniformi su tutta la sezione di un segmento, del fluido contenuto entro il dispositivo di centrifugazione 10. La possibilità di asportare in modo uniforme fluido dal fondo del recipiente di centrifugazione facilita il necessario procedimento di separazione del mezzo filtrante liquido che contiene i microbi patogeni dalle rimanenti parti della miscela costituita dal mezzo filtrante e del campione. Ciò è vero poiché si è riscontrato che se si usa un ago di tipo convenzionale (ad estremità aperta) l'azione del fluido aspirato entro di esso provocherà un flusso di fluido a forma conica su tutto il gradiente con la conseguenza che passeranno entro di esso quantità indesiderabili del

campione fluido. Ne risulta che parti del mezzo filtrante liquido non si asporteranno dal recipiente di centrifugazione 12.

Il contenuto sterile del recipiente di centrifugazione 12 comprende un mezzo filtrante liquido 38 e uno spazio 40 sotto vuoto completo o parziale. Lo spazio sotto vuoto 40 è mantenuto ad una pressione inferiore di quella atmosferica e precisamente ad un valore tale che il recipiente di centrifugazione possa accogliere una quantità nota di liquido mediante iniezione attraverso l'elemento di chiusura perforabile 16 senza che nell'interno di esso venga a crearsi una eccessiva pressione ciò che potrebbe provocare uno spostamento degli elementi di chiusura 14 e 16 dalle estremità del recipiente di centrifugazione 12.

Il mezzo filtrante liquido 38 può essere uno qualsiasi dei mezzi filtranti descritti nel brevetto USA N. 3 928 139 atti a rivelare la presenza di microbi patogeni ed in genere comprende una soluzione acquosa di qualsiasi soluto che non sia tossico per gli organismi microbici in sospensione e abbia una densità sufficientemente alta per consentire la sospensione in esso di cellule sanguigne bianche e rosse o di detriti cellulari sanguigni. Il soluto è preferibilmente non ionico. Dunque, il mezzo filtrante liquido presenta una densità superiore a quella del sangue cioè superiore a circa 1,06 gm/cc e terrà in sospensione cellule ematiche o detriti cellulari sanguigni ma sarà anche atta ad accogliere microbi patogeni. Inoltre il mezzo filtrante liquido conterrà preferibilmente una piccola quantità di agente gelificante sensibile alla temperatura.

Opportuni soluti che possono essere utilizzati nel mezzo filtrante liquido 38 comprendono gli zuccheri come saccarosio, glucosio, maltosio, fruttosio, mannitolo, sorbitolo e simili. In genere, il mezzo filtrante liquido 38 dovrebbe ammontare almeno a ca. 40% in peso dello zucchero e può contenere zucchero fino al limite di saturazione. Preferibilmente gli zuccheri sono contenuti nel mezzo filtrante liquido 38 in una quantità che varia da ca. 40 a ca. 50% in peso. In genere gli zuccheri ed in particolare il saccarosio sono soluti preferiti per il mezzo filtrante liquido 38 in quanto quest'ultimo può essere mantenuto ad un pH fisiologico ad es. 6,0-7,0 e, qualora combinato con gelatina, possono essere trattati in autoclave.

Si può usare in tale ambito qualsiasi soluto purché la soluzione risultante sia più densa delle cellule ematiche rosse e dei detriti cellulari sanguigni rossi e non sia tossica per i microbi patogeni. Altri simili sostanze opportune comprendono ad es. una sostanza chimica nota genericamente come «Hypaque sodium»  $C_{11}H_8I_3N_2NaO_4$  (sale sodico dell'acido 3,5 - diacetamido-2,4,6 - triiodobenzoico). Questa sostanza può essere utilizzata in soluzione acquosa nella stessa concentrazione indicata più sopra per lo zucchero. Un'altra classe di soluti che possono venire utilizzati per formare un mezzo filtrante liquido acquoso che serve allo scopo prefisso comprende soluti macro-molecolari atti a produrre una struttura gelatinosa liquida in mezzo acquoso avente pori con dimensioni sufficientemente piccole da impedire la penetrazione di cellule rosse o di detriti di cellule rosse ma abbastanza grandi da lasciar passare i microbi patogeni.

Un esempio di un opportuno soluto macromolecolare è un polimero solubile in acqua a legame reticolato avente micropori distribuiti su tutta la sua rete solubilizzata. Un simile polimero solubile in acqua comprende un copolimero di saccarosio e epicloridrina avente un peso molecolare medio che può variare da ca. 30 000 a ca. 500 000 ed una viscosità intrinseca di ca. 0,17 dl/g, una rotazione specifica  $(\alpha)_D^{20}$  di +56,5° e contiene materiale dializzabile in una quantità minore dell'1% in peso. Un simile polimero atto a questo scopo è venduto sotto il marchio «FICOLL» dalla Pharmacia Fine Chemicals, Inc. 800 Centennial Avenue, Piscataway, New Jersey. Un altro polimero di questo tipo che può essere usato anch'esso a questo scopo è il desterano avente un peso molecolare medio che

può variare da ca. 10 000 a ca. 2 000 000 ed è preferibilmente di ca. 50 000. Questi polimeri, qualora sciolti in acqua come descritto, funzionano come mezzo filtrante liquido per microbi patogeni e apparentemente presentano micropori su tutta la loro rete solubilizzata che variano da ca. 1 micron a ca. 7 micron.

Il polimero solubile in acqua o soluto macromolecolare è preferibilmente presente nella soluzione acquosa in una quantità che varia da ca. 10 a ca. 40% in peso e con particolare preferenza da ca. 20 a ca. 30% in peso.

Coll'espressione «agente gelificante termo sensibile» si intende qualsiasi agente che gelifichi la soluzione acquosa del mezzo filtrante 38 ad una temperatura in genere minore della temperatura ambiente ma che tuttavia può liquefare a temperature superiori che non sono deleterie per i microbi patogeni cioè inferiori a ca. 50°C ed in genere non superiori a ca. 42°C. Agenti gelificanti termosensibili adatti a questo scopo comprendono qualsiasi agente gelificante di questo tipo che non sia deleterio per la soluzione o per il campione in fase di analisi. Esempi di simili materiali sono gelatine cioè le proteine ottenute da collagene mediante bollitura in acqua di pelli, legamenti, tendini ossa e simili. Si può utilizzare qualsiasi quantità di agente gelificante termosensibile cioè ca. da 0,5 a ca. 5% in peso del mezzo filtrante 38.

Inoltre, secondo una forma preferita d'esecuzione si prevede il mezzo filtrante liquido contenga un captatore d'ossigeno (oxygen scavenger) e/o un colorante sensibile all'ossigeno. La presenza del captatore d'ossigeno assicurerà che l'interno del dispositivo mescolatore e centrifugatore 10 sia mantenuto in un ambiente anaerobico. Più specificatamente, dal punto di vista medico ci si interessa di infezioni batteriche anaerobiche del corpo umano. Se il test per isolare e rivelare microbi patogeni è eseguito in un ambiente aerobico è senz'altro chiaro che non sarà possibile rivelare la presenza di batteri anaerobici. Quindi la presenza di una piccola quantità effettiva di un agente riduttore (un captatore d'ossigeno di tipo convenzionale) è utilizzata entro un mezzo filtrante liquido 38 secondo lo scopo di una forma d'esecuzione preferita. Agenti riducenti utilizzabili per questo scopo comprendono L-cistina, tioglicolato di sodio, acido ascorbico e simili. La sostanza riducente preferita utilizzata nel mezzo filtrante liquido 38 per gli scopi prefissi è una miscela di L-cistina e tioglicolato di sodio. Inoltre rientra nell'ambito della forma d'esecuzione che detto mezzo filtrante liquido contenga una piccola quantità di colorante sensibile all'ossigeno. Detto colorante può essere utilizzato sia in presenza che in assenza dell'agente riducente menzionato più sopra. Il colorante è preferibilmente incolore in assenza di ossigeno ma cambia colore quando viene a contatto con l'ossigeno. Quindi un cambiamento di colore indica la presenza di ossigeno nell'interno del dispositivo mescolatore e centrifugatore 10 ciò che significa una perdita di vuoto in detto interno. Opportuni coloranti sensibili all'ossigeno che possono essere utilizzati allo scopo sono ad es. resazurina e blu di metilene. Sarà però anche possibile usare qualsiasi altro colorante sensibile all'ossigeno purché non risulti deleterio al mezzo filtrante liquido 38 e al procedimento di separazione microbica che ha luogo nell'interno del dispositivo mescolatore e centrifugatore 10. Un tipico mezzo filtrante liquido utilizzabile per gli scopi prefissi è il seguente:

50%	(peso/peso) saccarosio
1,5%	(peso/peso) gelatina
0,05%	(peso/volume) L-cistina
0,05%	(peso/volume) tioglicolato sodico
0,0001-0,0002%	(peso/volume) resazurina

pH a 6,0.

In genere, l'agente riducente può comprendere da 0,01 a ca. 0,2% in peso del mezzo filtrante liquido e il colorante sen-

sibile all'ossigeno può includere da 0,001 a ca. 0,0005% in peso del mezzo filtrante liquido.

Il fluido per il trattamento del campione 20 può contenere qualsiasi ingrediente o insieme di ingredienti coi quali si desidera trattare il campione fluido prima di separare da esso i microbi patogeni. Secondo una forma preferita d'esecuzione il fluido 20 per il trattamento del campione comprende una soluzione acquosa di un agente di lisi per il sangue. Si potrà utilizzare nella soluzione acquosa qualsiasi agente di lisi opportuno che non sia tossico per i microorganismi. Un opportuno agente di lisi è una soluzione acquosa non tossica di saponina. Si deve notare che molte saponine sono considerate tossiche per i microbi patogeni. Tuttavia, nel brevetto USA N. 3 883 425 rilasciato il 13 maggio 1975, avente come titolo: «Detossificazione delle saponine» ed incorporato per riferimento in questa domanda di brevetto, si descrive un metodo nuovo per togliere gli ingredienti tossici dalle saponine ritenute fino a questo momento tossiche. In generale la saponina tossica può essere detossificata secondo i dettami del brevetto menzionato più sopra ed il materiale purificato così risultante sarà utilizzabile per gli scopi prefissi. Inoltre, la soluzione acquosa può contenere un anticoagulante e/o un captatore d'ossigeno. Un anticoagulante di tipo preferito è il sodiopoli-anetolsulfonato (SPS) o Heparina. Il sodiopoli-anetolsulfonato è preferibile perché non agisce solo da anticoagulante ma inibisce pure l'attività fagocitica di granulociti e monociti e l'attività antibatteriale normale del siero e di certi antibiotici ad es. streptomycina polimixina.

L'apparecchio mescolatore e centrifugatore in oggetto consente un procedimento conveniente ed economico per combinare un campione ad es. sangue con un fluido per il trattamento del campione del tipo descritto più sopra immediatamente prima di depositare detto campione sul mezzo liquido filtrante per l'esecuzione del test. In diversi casi, si è riscontrato che certi fluidi di trattamento ad es. agenti di lisi sono incompatibili col mezzo filtrante liquido. Inoltre anche se gli agenti di trattamento potessero essi mescolati col mezzo filtrante liquido, detti agenti non potrebbero diffondersi facilmente entro il campione. Ad es. se non si desiderano grumi l'anticoagulante deve disperdersi nel campione di sangue entro pochi minuti. Pertanto se l'anticoagulante fosse incorporato nel mezzo filtrante liquido ci vorrebbero ca. 24 ore fino a che l'anticoagulante si disperda nel campione di sangue. Quindi è indesiderabile pre-mescolare il fluido di trattamento con il mezzo filtrante prima di chiudere a tenuta il mezzo filtrante nell'atmosfera sterile del recipiente di centrifugazione.

È pure indesiderabile pre-mescolare il fluido trattante col provino prima di introdurlo nel recipiente di centrifugazione poiché questa fase extra costituisce un'opportunità di contaminazione del campione da parte delle condizioni ambiente del laboratorio. Si prevedono mezzi per miscelare il campione con il fluido trattante immediatamente prima che venga a contatto col mezzo filtrante liquido così da mantenere minime le possibilità di contaminazione da parte dell'ambiente del laboratorio. Si ottiene ciò alimentando alla camera 16a del fluido di trattamento del primo elemento di chiusura perforabile 16 una quantità appropriata di fluido 20 per il trattamento del provino e precisamente in uno dei modi menzionati più sopra. Dopo aver fatto ciò e dopo che il recipiente di centrifugazione contenente il mezzo filtrante liquido è stato chiuso a tenuta mediante il primo elemento di chiusura perforabile 16 l'apparecchio è pronto per eseguire il test. Naturalmente il mezzo filtrante liquido sarà già depositato nel recipiente di centrifugazione e lo spazio sopra di esso sarà evacuato in modo sterile dopo aver effettuato la chiusura. Il nuovo stiletto 23 rappresentato nelle figg. 9 e 10 per iniettare il provino viene ora inserito attraverso il primo elemento di chiusura perforabile 16 così che le aperture 24 e 26 lungo la sua parete vengano a trovarsi en-

tro la camera del fluido di trattamento 16a dell'elemento di chiusura perforabile 16. Dopo aver iniettato il campione quest'ultimo viene a contatto e viene mescolato con il fluido di trattamento del campione nel modo descritto in precedenza. Si deposita quindi la miscela fluido di trattamento-campione sul mezzo filtrante liquido.

Con riferimento alle figg. 2 a 8 si descriverà ora in quel che segue l'utilizzazione dell'apparecchio mescolatore e centrifugatore 10 per quel che riguarda un procedimento atto a rivelare la presenza di microbi patogeni. Il mezzo filtrante liquido 38 può comprendere 1,5 millilitri di una soluzione acquosa contenente 3,0 parti in peso di gelatina; 97,0 parti in peso di acqua; 100,0 parti in peso di saccarosio; 0,8 parti in peso di L-cistina; 0,8 parti in peso di tioglicolato sodico e 0,0003 parti in peso di resazurina, ad esempio.

Il fluido 20 per il trattamento del campione può contenere qualsiasi opportuno componente ad es. un agente di lisi e/o un anticoagulante e, se lo si desidera, un captatore d'ossigeno o agente riducente in qualsiasi concentrazione desiderata. Si può usare qualsiasi quantità di anticoagulante che sia sufficiente per la quantità di campione di sangue e qualsiasi quantità di agente di lisi sufficiente per effettuare la lisi del campione di sangue. Ad es. si può usare come fluido di trattamento 0,3 millilitri di una soluzione acquosa contenente a ca. 12% in peso di saponina non tossica e ca. 2% in peso di sodiopoliacetolsulfonato. Inizialmente si disporrà l'apparecchio mescolatore e centrifugatore 10 in posizione eretta come illustrato in fig. 2 per consentire che il mezzo filtrante liquido 38 passi verso il basso contro l'elemento di chiusura perforabile 14. Successivamente il dispositivo mescolatore e centrifugatore 10 è messo in una opportuna unità di raffreddamento, ad es. un refrigeratore dove viene rapidamente raffreddato in modo sufficiente a far sì che la gelatina solidifichi il mezzo filtrante liquido 38. Ad es. l'apparecchio mescolatore e centrifugatore può essere raffreddato rapidamente a 4°C. Questa fase è illustrata in fig. 3. Successivamente si preleva con la siringa 42, avente un ago ipodermico di tipo convenzionale, un campione fluido ad es. sangue (ad es. 8 ml). L'ago ipodermico convenzionale viene poi sostituito con il nuovo stiletto 23 che viene poi iniettato attraverso l'elemento di chiusura perforabile 16 nel modo descritto più sopra e il campione fluido viene quindi iniettato nell'interno dell'apparecchio mescolatore e centrifugatore 10 nella maniera schematica illustrata in fig. 4. La turbolenza creata dal passaggio del sangue nello spazio sotto vuoto 40 non disturberà il mezzo filtrante 38 che rimarrà sotto forma di strato solido di fondo come illustrato in fig. 4.

La miscelazione del campione di sangue col fluido di trattamento 20 contenente l'agente di lisi farà sì che le cellule sanguigne rosse vengano lisate ciò che minimizzerà il possibile effetto di intrappolamento o intercettazione degli eritrociti. Questo effetto di intercettazione consisterà in generale in ciò che gli eritrociti e linfociti si ammucchiano sulla sommità del mezzo filtrante liquido durante la fase di centrifugazione e le cellule così ammucchiate intercetteranno i microbi patogeni al loro passaggio verso il basso durante la centrifugazione impedendo loro così di raggiungere il mezzo filtrante liquido. Inoltre il sodiopoliacetolsulfonato contenuto entro il fluido 20 per il trattamento del campione agisce come anticoagulante ed inibisce l'attività fagocitica dei granulociti e monociti e la normale attività antibatterica del siero una volta che è mescolato col campione di sangue.

Successivamente, si ritira lo stiletto 23 dall'elemento di chiusura perforabile 16 e l'apparecchio mescolatore e centrifugatore 10 contenente il mezzo filtrante liquido 38 allo stato di gelo e il campione di sangue mescolato col fluido 20 di trattamento indicati in figg. 4 e 5 come miscela 44 viene riscaldato in posizione eretta tanto da fondere la gelatina e a far sì che il mezzo filtrante liquido 38 si liquefaccia. L'apparecchio mesco-

latore e centrifugatore 10 viene riscaldato ad una temperatura che non distrugga i microbi patogeni che dovessero trovarsi nel campione di sangue ma che sia sufficiente a liquefare la gelatina. Ad es. mentre si trova nella posizione illustrata in fig. 5, l'apparecchio mescolatore e centrifugatore 10 può essere riscaldato per immersione in un bagno di acqua fino ad una temperatura stabilita a ca. 37 a 42°C. Mediante la liquefazione della gelatina entro il mezzo filtrante liquido 38 si ottiene una soluzione liquefatta pronta ad agire da mezzo filtrante per i microbi patogeni.

La separazione dei microbi patogeni dalla parte rimanente del campione di sangue è effettuata mettendo il dispositivo mescolatore e centrifugatore 10 in un opportuno apparecchio di centrifugazione sottoponendolo ad una forza centrifuga sufficiente a separare i microbi patogeni dai rimanenti elementi che costituiscono il campione di sangue. La velocità ed il tempo di centrifugazione possono variare grandemente a secondo della resistenza del materiale di cui è composto il recipiente di centrifugazione e del tipo di apparecchio di centrifugazione. La centrifugazione può essere eseguita convenientemente impartendo al dispositivo mescolatore e centrifugatore tra ca. 100 e 6000 unità gravitazionali e preferibilmente da ca. 1400-5000 unità gravitazionali. Un opportuno procedimento comprende l'uso di un rotore centrifugo a paniere oscillante che imparte al particolare sistema secondo questa forma d'esecuzione tra 2000 e 4000 unità gravitazionali per 10 a 20 minuti. La fase di centrifugazione è illustrata schematicamente in fig. 6.

Dopo la fase di miscelazione e centrifugazione descritta più sopra, si inietta una siringa sterile 46 portante un nuovo stiletto di tipo eccellente 35 attraverso il secondo elemento perforabile 14 del dispositivo di centrifugazione come illustrato in fig. 7. Come indicato, lo stiletto può presentare qualsiasi lunghezza opportuna; tuttavia le aperture 36 nella parete dello stiletto vengono a trovare molto vicine alla superficie interna 18 dell'elemento di chiusura perforabile 14 dopo l'iniezione dello stiletto rappresentato in fig. 7. Essendo la punta 34 dello stiletto 35 chiusa a pinza sarà possibile estrarre lo strato sottile uniforme del mezzo filtrante liquido che giace adiacente alla superficie piana interna dell'elemento di chiusura perforabile 14. Grazie alla superficie interna piana dell'elemento di chiusura perforabile 14 è possibile vedere chiaramente attraverso la parete del recipiente di centrifugazione 10 così che il tecnico addetto a questo lavoro possa osservare facilmente l'operazione di estrazione del mezzo filtrante. Se lo si desidera, si può usare ad es. una siringa ed un ago di tipo convenzionale per estrarre inizialmente la miscela 44 dal recipiente di centrifugazione e quindi mescolare il mezzo filtrante liquido ed asportarlo per mezzo di un stiletto 35.

Il mezzo filtrante liquido 38 estratto mediante la siringa 46 viene quindi preferibilmente agitato ad es. scuotendolo in modo che i microbi patogeni si mescolino intimamente e si distribuiscano entro di esso in modo uniforme. Il mezzo filtrante liquido 38 contenente i microbi patogeni dispersi viene quindi distribuito su di un opportuno terreno di crescita batteriale nella fase di cultura che è rappresentata schematicamente nella fig. 8 dei disegni.

Ad es., con 1-1/2 millilitri di mezzo filtrante liquido contenente microbi patogeni, una piastrina di agar sanguigno può accogliere 0,2 millilitri di terreno di cultura e la piastrina può essere incubata a 37°C in un'atmosfera aerobica. Un'altra piastrina di agar sanguigno può accogliere 0,2 millilitri di una soluzione acquosa e può essere incubata a 37°C in un vaso-candela. Un'altra piastrina di agar sanguigno può accogliere 0,2 millilitri di una soluzione acquosa e può essere incubata a 37°C in un ambiente anaerobico. Altri 0,2 millilitri della soluzione possono essere predisposti su una piastrina agar «saboraud» ed incubati a 25°C in un ambiente aerobico. Altri 0,2 millilitri della soluzione possono essere predisposti su una

piastrina EMB (colorante di eosina e blu di metilene) ed incubati a 37°C in un vaso-candela. Altri 0,5 millilitri di soluzione possono essere predisposti in un mezzo di tioglicolato liquido ed incubati a 37°C. Il terreno di crescita può essere verificato giornalmente controllando la presenza di colonie. Si può determinare il numero di microbi patogeni in 1 millilitro di sangue moltiplicando il numero di colonie per un fattore di correzione. Quest'ultimo tiene in considerazione la velocità di ricupero di un dato organismo, i volumi di sangue e le soluzioni filtranti liquide usate come pure la quantità di miscela finale messa su piastrine. Nell'esempio generico indicato più sopra il fattore di correzione è di 1,56.

Si noti che mentre i disegni illustrano una forma preferita di questa invenzione atta a permettere l'esecuzione del test descritto più sopra relativo ai microbi patogeni, saranno pure possibili altre forme d'esecuzione leggermente modificate. Ad es. si può sostituire al recipiente di centrifugazione 10 una

semplice provetta. In questo caso si possono usare l'elemento di chiusura perforabile 16 e l'eccellente stiletto 23 senza prevedere il secondo elemento di chiusura 14. In realtà lo stiletto e l'elemento di chiusura perforabile 16 che racchiude la camera per il fluido di trattamento possono essere usati in combinazione con qualsiasi recipiente col quale si desidera miscelare completamente un fluido con un altro prima di mettere a contatto la miscela risultante con un terzo fluido contenuto nel recipiente. L'elemento di chiusura perforabile che comprende la camera per il fluido di trattamento può essere di forma qualsiasi purché chiuda a tenuta il recipiente in combinazione col quale viene usato. Dunque, per quanto la presente invenzione sia stata descritta con riferimento a certe sue forme d'esecuzione preferite si intende che potrebbero esserci diverse forme modificate che appariranno senz'altro possibili a chiunque è competente in questo ramo della tecnica leggendo la descrizione data più sopra.

