

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 835**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07290757 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1873231**

54 Título: **Un método y unidad para preparar una muestra para el análisis microbiológico de un líquido**

30 Prioridad:

**27.06.2006 FR 0605796**

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

**05.03.2014**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 CONCORD ROAD  
BILLERICA, MASSACHUSETTS 01821, US**

72 Inventor/es:

**RIBAUT, SÉBASTIEN y  
WAICHE, GAËL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 445 835 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Un método y unidad para preparar una muestra para el análisis microbiológico de un líquido

La presente invención se refiere a la preparación de una muestra para el análisis microbiológico de un líquido.

5 Es sabido que existen líquidos que pueden contener diferentes tipos de microorganismos, entre los que el análisis microbiológico solamente debe tener interés por uno o varios tipos.

Estos líquidos existen, por ejemplo, al final de una cadena de fabricación de anticuerpos monoclonales. Más particularmente, tales líquidos que son portadores de células eucarióticas que han permitido producir los anticuerpos, pueden, posiblemente, estar contaminados con bacterias y/o virus.

10 La presencia de las células eucarióticas puede obstaculizar el análisis microbiológico de las bacterias y virus, o bien por liberación de toxinas que pueden afectar adversamente al crecimiento de los microorganismos en el caso de detección convencional en un medio de crecimiento en estado de gel (detección de falsos negativos), o bien por perturbación de la lectura de los resultados en el caso de una detección rápida (detección de falsos positivos) por luminiscencia, fluorescencia, por amplificación o hibridación o por cualquier otro método de análisis de los ácidos nucleicos de esos microorganismos.

15 Con objeto de llevar a cabo un análisis fidedigno de este tipo de líquidos, es apropiado preparar una muestra en la que se haya llevado a cabo una selección de solamente los microorganismos (las bacterias y/o virus en el ejemplo dado anteriormente) pertenecientes a los tipos de microorganismos que se desea detectar.

20 Ya se conocen métodos de preparación de muestras para el análisis de un líquido en el que los microorganismos a detectar se seleccionan basándose en las diferencias de características morfológicas (físicas y/o químicas) que existen entre los diferentes tipos de microorganismos.

25 Más particularmente, ya se conoce un método de preparación que comprende una etapa de selección que consiste en añadir al líquido a analizar un reactivo adaptado para llevar a cabo una lisis específica de los microorganismos que pertenecen a los tipos de microorganismos que no se desea mantener en la muestra, filtrar después el líquido sobre una membrana para recoger de este modo sobre esa membrana una muestra que contiene únicamente los microorganismos a detectar y que no han reaccionado específicamente con el agente de lisis (los que han sufrido la lisis han sido destruidos y han atravesado la membrana). La muestra así recogida se recupera luego para analizarla por medio de técnicas de análisis microbiológico, convencionales o rápidas.

Otro método de preparación de la muestra consiste en separar de los otros los microorganismos a mantener, en virtud de sus diferencias de masa, por centrifugación a baja velocidad.

30 También se conoce ya otro método, que comprende la etapa de procurar una unidad con dos membranas, cada una de las cuales tiene un diámetro diferente de poro (una membrana para separar los contaminantes, y la segunda para recoger los microorganismos), conforme al documento US 2004/0.219.628.

La invención se refiere a la preparación de una muestra según un método similar que, al mismo tiempo, tiene un comportamiento mejorado y que es más sencillo y más conveniente para realizar.

35 A este fin, la invención proporciona un método de preparación de una muestra para el análisis microbiológico de un líquido que puede contener microorganismos de varios tipos diferentes, cada uno de los cuales posee características morfológicas predeterminadas, cuyo método comprende la etapa de realizar una selección de los microorganismos de dichos tipos de microorganismos, cuya etapa de realizar una selección comprende:

40 - la etapa de procurar una unidad para prepara dicha muestra, que comprende un cuerpo generalmente tubular dentro del cual están fijadas una primera y una segunda membranas, cuyo cuerpo tiene una abertura para introducir dicho líquido, un primer compartimento entre dicha abertura de introducción y dicha primera membrana, un segundo compartimento entre dichas primera y segunda membranas, y un tercer compartimento situado sobre el lado opuesto de dicha segunda membrana desde dicha primera membrana, cuya primera membrana tiene un primer diámetro de poro predeterminado y cuya segunda membrana posee un segundo diámetro de poro predeterminado, menor que dicho primer diámetro de poro predeterminado, de dicha primera membrana;

45 - la etapa de hacer pasar un volumen predeterminado de dicho líquido desde el primer al segundo compartimento a través de dicha primera membrana;

50 - la etapa de pasar todo el filtrado, que ha alcanzado de este modo el segundo compartimento, desde el segundo al tercer compartimento a través de dicha segunda membrana con objeto de recoger dicha muestra sobre dicha segunda membrana con dichos microorganismos seleccionados de dichos tipos diferentes de microorganismos que son aquellos cuyo tamaño es menor que el diámetro de poro predeterminado de dicha primera membrana y mayor que el diámetro de poro predeterminado de dicha segunda membrana; y

- la etapa de recuperar dicha muestra recogida de este modo sobre dicha segunda membrana;

caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar una unidad de preparación en cuyo cuerpo está formada una abertura auxiliar capaz de ser destapada, que comunica con dicho segundo compartimento y por que la etapa de recuperar dicha muestra comprende la etapa de destapar dicha abertura, la etapa de depositar un agente para lisar dichos microorganismos seleccionados, sobre dichas  
5 segunda membrana mediante dicha abertura auxiliar, y después la etapa de hacer pasar el lisado formado de este modo desde el segundo al tercer compartimento a través de dicha segunda membrana.

En el método según la invención, la muestra formada con los microorganismos a analizar (bacterias y/o virus, por ejemplo) se recoge sobre la segunda membrana después de haber sido separada de los microorganismos indeseados (por ejemplo, células eucarióticas) de tamaño demasiado grande para atravesar la primera membrana.

- 10 Una selección tal de los microorganismos basada en sus diferencias de tamaño es particularmente eficaz, frecuentemente más que la selección de los métodos de la técnica anterior anteriormente citados.

- 15 Una explicación de este hecho parece ser que, en el caso de la centrifugación, una parte de los microorganismos a recoger queda retenida por fuerza centrífuga en los microorganismos a eliminar; y, en el caso de lisis química, que el agente de lisis nunca es perfectamente selectivo de tal modo que una proporción pequeña, no cero, de los microorganismos a recoger sufre lisis y, por tanto, no queda recogida sobre la membrana, mientras que en el método según la invención (selección por tamaño), tales efectos marginales son desdeñables o incluso no existen-

- 20 Según características preferidas, por razones de sencillez y de conveniencia con respecto tanto a la fabricación como al uso, la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar una unidad de preparación cuyo cuerpo comprende una primera parte a la cual está fijada dicha primera membrana y una segunda parte a la cual está fijada dicha segunda membrana, pudiendo separar dichas partes una de otra.

Así pues, es posible, mediante un cuerpo formado con dos parte separables, además de la apertura proporcionada en tal cuerpo, tener acceso a la segunda membrana y más particularmente, a la cara de la segunda membrana sobre la que ha sido recogida la muestra.

Según otras características preferidas, por las mismas razones que las establecidas anteriormente:

- 25 - la etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas se llevan a cabo colocando dicho tercer compartimento a presión reducida;
- las etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas se llevan a cabo colocando dicho primer compartimento a presión aumentada;
- 30 - la etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas se llevan a cabo por centrifugación de dicha unidad de preparación;
- la etapa de conseguir una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar como dicha primera membrana, una membrana de diámetro de poro mayor que 1  $\mu\text{m}$ ;
- la etapa de conseguir una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar como dicha segunda membrana, una membrana de diámetro de poro menor que 0,65  $\mu\text{m}$ ; y/o
- 35 - la etapa de conseguir una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar como dicha segunda membrana, una membrana de diámetro de poro menor que 0,1  $\mu\text{m}$ .

- 40 Conforme a un segundo aspecto, la invención se refiere también a una unidad para preparar una muestra adecuada para la puesta en práctica del método según se ha expuesto anteriormente, que comprende un cuerpo generalmente tubular dentro del cual están fijadas una primera y una segunda membranas, cuyo cuerpo tiene una abertura para introducir dicho líquido, un primer compartimento entre dicha abertura de introducción y dicha primera membrana, un segundo compartimento entre dichas primera y segunda membranas, y un tercer compartimento sobre el lado opuesto de dicha segunda membrana desde dicha primera membrana, cuya primera membrana tiene un primer diámetro de poro predeterminado y cuya segunda membrana tiene un segundo diámetro de poro predeterminado, menor que dicho primer diámetro de poro predeterminado de dicha primera membrana, estando adaptada dicha  
45 unidad para hacer pasar un volumen predeterminado de dicho líquido desde el primer al segundo compartimento, por dicha primera membrana pasando entonces todo el filtrado, que ha alcanzado así el segundo compartimento, desde el segundo al tercer compartimento a través de dicha segunda membrana, con objeto de recoger dicha muestra sobre dicha segunda membrana, cuyo cuerpo comprende también medios para recuperar dicha muestra recogida de este modo sobre dicha segunda membrana, caracterizado por que dichos medios de recuperación  
50 comprenden una abertura formada en dicho cuerpo, capaz de ser destapada y que comunica con dicho segundo compartimento.

La unidad de preparación está proyectada, por tanto, para hacer posible el paso de la totalidad del volumen predeterminado a través de las dos membranas (con la excepción, como es natural, de las partes retenidas por las membranas), y, además, tener acceso a la muestra en virtud de los medios de recuperación de la muestra.

5 Ha de apreciarse que una unidad de filtración sencilla con varios pisos, por ejemplo una unidad de clarificación de soluciones, no sería capaz de servir como una unidad de preparación según la invención, dado que una unidad de filtración tal no está hecha con membranas, ni estaría adaptada para pasar todo el filtrado que llega, a un compartimento intermedio a través del segundo piso (siempre quedaría un filtrado residual) y/o carecería de medios para recuperar la muestra.

Según características preferidas, por razones de sencillez y conveniencia con respecto tanto a la fabricación como al uso, dicha primera membrana es permeable al aire cuando está húmeda.

10 De este modo, cuando el líquido ha sido vaciado completamente desde el primer compartimento y la primera membrana se pone en contacto con el aire por el lado que está vuelto hacia tal compartimento, la membrana, en virtud de del suficiente tamaño de los poros, permanece permeable al aire (sin fenómeno de punto de burbuja) de tal modo que el aire pueden penetrar por esta membrana hacia el segundo compartimento permitiendo que el líquido que contiene sea evacuado.

Según otras características preferidas, por las mismas razones que las anteriormente expuestas:

- los poros de dicha primera membrana tienen un diámetro mayor que  $1 \mu\text{m}$ ;
- 15 - los poros de dicha segunda membrana tienen un diámetro menor que  $0,65 \mu\text{m}$ ;
- los poros de dicha segunda membrana tienen un diámetro menor que  $0,1 \mu\text{m}$ ;
- dicho cuerpo comprende una primera parte a la que está fijada dicha primera membrana y una segunda parte a la que está fijada dicha segunda membrana;
- dicho cuerpo comprende un receptáculo que delimita dicho tercer compartimento; y/o
- 20 - dicho receptáculo puede separarse.

Las características y ventajas de la invención pueden ponerse de manifiesto mediante la descripción que sigue, dada por medio de ejemplos preferidos pero no limitativos, con referencia a los dibujos que se acompañan en los que :

- 25 - la Figura 1 es una vista en corte transversal de una unidad de preparación, que es útil para la comprensión de la invención;
- la Figura 2 es una vista de la unidad, similar a la Figura ,1 pero en la que las dos partes de un cuerpo de esta unidad que habían estado encajadas, han sido separadas;
- la Figura 3 es una vista similar a la Figura 1, de una segunda realización de la unidad de preparación, que es útil para la comprensión de la invención; y
- 30 - la Figura 4 es una vista similar a la Figura 1, de una tercera realización de la unidad de preparación, que es según la invención.

La unidad de preparación 1 ilustrada en la Figura 1, comprende un cuerpo generalmente tubular 2, en el interior del cual están fijadas una membrana 3, una membrana 4 y dos soportes porosos 5 y 6.

35 Las membranas 3 y 4 son de polifluoruro de vinilideno (PVDF), la membrana 3 tiene poros de diámetro igual a  $5 \mu\text{m}$  y la membrana 4 tiene poros de diámetro igual a  $0,4 \mu\text{m}$ .

El cuerpo 2 está formado por una parte 9 y una parte 10, encajadas una en la otra. La parte 9 tiene una abertura 7 para la introducción del líquido, mientras que la parte 10 tiene una abertura 8 para la salida del líquido.

40 La parte 9 posee una primera parte cilíndrica, 15, que delimita la abertura 7 en un lado y que por el lado opuesto se une a una segunda parte 16 que también es cilíndrica y de diámetro menor que el de la parte 15, estando conectadas una a otra las partes 15 y 16 por una pared anular transversal, 17.

Adyacente a la pared transversal 17 está fijado el soporte poroso 5 y está unida herméticamente la membrana 3 que se apoya por su cara 12 en el soporte poroso 5 desde el mismo lado que la abertura 7 (Figura 1).

45 La parte 10 comprende una primera parte cilíndrica 20, de diámetro sustancialmente igual al diámetro de la parte cilíndrica 15, una segunda parte cilíndrica 21, de diámetro sustancialmente igual al diámetro de la parte cilíndrica 16, y una tercera parte cilíndrica 22, de diámetro menor que el diámetro de la parte 21 y que delimita la abertura 8.

Las partes 20 y 21 están conectadas una a otra por una pared anular transversal 23, mientras que las partes 21 y 22 están conectadas una con otra por una pared anular transversal 24.

Adyacente a la pared anular 23 está fijado el soporte poroso 6 y está unida herméticamente la membrana 4, que se apoya por su cara 14 en el soporte poroso 6, enfrentándose la cara 13 de esa membrana al soporte poroso 5 (Figura 1).

5 La parte 9 con la membrana 3 delimita un compartimento 26, para la admisión del líquido a filtrar, delimitando las partes 9 y 10 en estado encajado, con las membranas 3 y 4, un compartimento intermedio 27, mientras que la parte 10 con la membrana 4 delimita un compartimento 28, para la evacuación del líquido.

En el estado encajado de la parte 9 en la parte 10 del cuerpo 2, la superficie de la parte cilíndrica 16 vuelta hacia el exterior, se enfrenta a la superficie interna de la parte cilíndrica 20 al tiempo que se apoya una en otra por deformación elástica, manteniendo de este modo las partes 9 y 10 juntas, sujetas.

10 Ahora se hará una descripción de las diferentes etapas de preparación de una muestra procedente de un líquido a analizar que puede contener células eucarióticas y bacterias, cuya presencia se desea detectar entre esas células.

En una primera etapa, el técnico operador conecta la parte cilíndrica 22 con una fuente de vacío (una bomba de vacío, por ejemplo) para colocar el compartimento 28 a presión reducida y hace llegar un volumen de líquido predeterminado (por ejemplo, 10 ml) al compartimento 26.

15 La colocación del compartimento 28 a presión reducida da lugar a la colocación a presión reducida del compartimento 27 de modo que el volumen de líquido predeterminado es succionado y atraviesa la membrana 3 y el soporte 5 ocupando el compartimento 27.

20 Los poros de la membrana 3 están dimensionados de tal modo que solamente los microorganismos de máximo tamaño, en este caso las células eucarióticas, quedan retenidos por tal membrana, mientras que los otros microorganismos, en este caso las bacterias, pasan a través de ella y del soporte poroso 5 llegando en el filtrado a ocupar el compartimento 27.

Además, el gran tamaño de los poros de la membrana 3 significa que incluso cuando la membrana está húmeda, permanece permeable al aire (ausencia del fenómeno de punto de burbuja) de modo que el aire puede penetrar en el compartimento 27 por la membrana 3.

25 Dado que esta membrana permite que pase el aire, el filtrado contenido en el compartimento 27 fluye después a través de la membrana 4 y el soporte 6 ocupando el compartimento 28 y sale después del cuerpo 2 a través de la abertura de salida 8.

Los poros de la membrana 4 están dimensionados de modo que retienen las bacterias que se desea detectar.

Una vez realizadas estas operaciones, el técnico operador desconecta la fuente de vacío de la parte cilíndrica 22.

30 Seguidamente separa las partes 9 y 10 deslizando la parte 9 con respecto a la parte 10 de modo que se separan una de otra como ilustra la Figura 2.

La membrana 4 y en particular la cara 13 de la membrana sobre la que la muestra ha sido recogida, se hace así accesible.

35 Entonces es posible extraer la membrana para ponerla en contacto con un medio de crecimiento gelificado y colocar después el conjunto en un incubador para incubar las bacterias,

Otra solución consiste en tratar esa membrana (después de haber o no haber sido extraída de la parte 10) depositando sobre ella, por el lado de la cara 13, un reactivo que revele la presencia del ATP de las bacterias por luminiscencia, y otra posibilidad es un reactivo que haga posible identificar las bacterias por fluorescencia.

40 Todavía otra solución consiste en analizar el DNA de las bacterias recogidas sobre la membrana 4 mediante un método convencional (por ejemplo, del tipo de PCR).

También es posible, si se desea recuperar la muestra independientemente de la membrana, depositar sobre la membrana un agente para realizar la lisis de las bacterias.

45 Mediante la conexión de nuevo de la unidad a una fuente de vacío, el lisado que contiene el material biológico de las bacterias atraviesa después la membrana 4 y luego el compartimento 28 para ser recogido en un recipiente dispuesto situado alejado de la abertura 8.

El líquido recuperado en este recipiente puede ser analizado luego mediante un método rápido de detección microbiológica (por ejemplo, por luminiscencia).

50 El uso combinado de la unidad con los métodos rápidos de detección de los microorganismos, hace posible verificar en períodos de tiempo cortos y a gran escala, todo tipo de muestras líquidas que pudieran contener diversos tipos de microorganismos.

Otra realización de la unidad de preparación está representada en la Figura 3.

En general, para miembros similares han sido empleadas las mismas referencias numéricas a las que se ha añadido el número 100.

5 La unidad de preparación 101 está adaptada para ser colocada en una centrífuga para hacer que el líquido pase a través de las dos membranas sin tener que colocar la unidad de preparación a presión reducida.

10 En esta realización, la parte anular 24, y la parte cilíndrica 22, han sido eliminadas, mientras que la parte cilíndrica 121 está extendida con respecto a la parte 21 de la realización precedente, de modo que es posible ajustar en ella un receptáculo 130, perteneciente al cuerpo 102, para extraer el segundo filtrado cuando el líquido sale de la abertura 108 o bien recuperar un lisado en ese receptáculo, una vez que el segundo filtrado ha sido vaciado, cuando se desea recuperar la muestra independientemente desde la membrana 4 (depositando un agente de lisis sobre esa membrana).

15 De este modo el receptáculo está adaptado para ser separado de la parte 110 (por deslizamiento a lo largo de la parte cilíndrica 121), o bien para vaciar el segundo filtrado o bien para obtener acceso al lisado, con objeto de realizar una detección microbiológica rápida de ese lisado, por ejemplo, por adición al receptáculo de un reactivo que revele la presencia de ATP por luminiscencia.

Otra realización está representada en la Figura 4.

En esta realización, la unidad de preparación 201 tiene una estructura similar a la de la unidad de preparación 101, aparte de una abertura 232, cerrada de modo hermético a los fluidos por medio de un tapón separable 233, que está proporcionado lateralmente en la parte cilíndrica 220 de la parte 210 del cuerpo 202.

20 Una vez preparada la muestra y retirado el tapón 233, esta abertura hace posible, según la invención, obtener acceso al compartimento 227 y, en particular, a la cara 13 de la membrana 3, para depositar allí un agente de lisis, sin tener que separar las partes 209 y 210 del cuerpo 202, recuperándose luego el material biológico de los microorganismos en el receptáculo 230.

25 En una variante, los poros de la membrana 4 tienen un diámetro menor que 0,1  $\mu\text{m}$  para recoger así bacterias y/o virus sobre la membrana.

30 Todavía en otra variante, el líquido se hace pasar a través de las membranas 3 y 4 colocando la cámara de admisión 26 a presión aumentada, por ejemplo, utilizando un pistón encajado en la parte cilíndrica 15, de modo que queda entre el pistón y el líquido un volumen de aire. Cuando se hace funcionar, el pistón da lugar al desplazamiento del volumen de líquido así como también al volumen de aire comprimido entre el pistón y el líquido, de modo que el compartimento 26 queda colocado a presión aumentada. El líquido, por consiguiente, penetra en el compartimento 27 y luego es inundado por el aire impulsado por el pistón, cuyo aire, a su vez, penetra en el compartimento 27 a través de la membrana 3 que permanece permeable al aire.

Todavía, en otra variante, los microorganismos a detectar no son bacterias ni virus, sino levaduras (de tamaño lo suficientemente pequeño para no ser retenidas por la primera membrana) o mohos, por ejemplo.

35 En otra variante, todavía, el líquido a analizar no contiene células eucarióticas sino otros tipos de microorganismos (a separar de los microorganismos que han de detectarse) tales como levaduras o bien hongos filamentosos.

De nuevo, en otra variante, las dos partes del cuerpo de la unidad de preparación están juntas, unidas mediante ajuste rápido, y la separación de las partes se lleva a cabo, por ejemplo, rompiendo las bases del ajuste rápido.

40 Todavía en otra variante, las dos partes forman una sola pieza y están conectadas por una zona quebradiza que ha de romperse con objeto de separar una de otra.

En otra variante, todavía, la membrana que recoge la muestra no está unida herméticamente al cuerpo de la unidad de preparación, sino que está comprimida contra un cierre de junta tórica y/o las membranas están formadas con poli(éter sulfona) (PES), policarbonato, poliéster u otra posibilidad, que es un éster de celulosa.

45 La presente invención no está limitada a la realización descrita y representada, sino que cubre cualquier forma de variante.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de preparación de una muestra para el análisis microbiológico de un líquido que puede contener microorganismos de varios tipos diferentes, cada uno de los cuales posee características morfológicas predeterminadas, cuyo método comprende la etapa de hacer una selección de los microorganismos de dichos tipos diferentes de microorganismos, cuya etapa de hacer una selección comprende:
- 5
- la etapa de procurar una unidad (201) para preparar dicha muestra, que comprende un cuerpo generalmente tubular (202) dentro del cual están fijadas una primera (3) y una segunda (4) membranas, cuyo cuerpo (202) tiene una abertura (207) para introducir dicho líquido, un primer compartimento (226) entre dicha abertura de introducción (207) y dicha primera membrana (3), un segundo compartimento (227) entre dichas primera (3) y segunda (4) membranas, y un tercer compartimento (228) situado sobre el lado opuesto de dicha segunda membrana (4) desde dicha primera membrana (3), cuya primera membrana (3) tiene un primer diámetro de poro predeterminado y cuya segunda membrana (4) tiene un segundo diámetro de poro predeterminado, menor que dicho primer diámetro de poro predeterminado, de dicha primera membrana (3);
  - 10
  - la etapa de hacer pasar un volumen predeterminado de dicho líquido desde el primer compartimento (226) al segundo compartimento (227) a través de dicha primera membrana (3);
  - 15
  - la etapa de hacer pasar todo el filtrado, que ha alcanzado de este modo el segundo compartimento (227), desde el segundo compartimento (227) al tercer compartimento (228) a través de dicha segunda membrana (4) con objeto de recoger dicha muestra sobre dicha segunda membrana (4) con dichos microorganismos seleccionados de dichos tipos diferentes de microorganismos que son aquellos cuyo tamaño es menor que el diámetro de poro predeterminado de dicha primera membrana (3) y mayor que el diámetro de poro predeterminado de dicha segunda membrana (4); y
  - 20
  - la etapa de recuperar dicha muestra recogida de este modo sobre dicha segunda membrana (4)
- caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar una unidad de preparación (201) en cuyo cuerpo (202) está formada una abertura auxiliar (232) capaz de ser destapada que comunica con dicho segundo compartimento (227) y por que la etapa de recuperar dicha muestra comprende la etapa de destapar dicha abertura (232), la etapa de depositar un agente para lisar dichos microorganismos seleccionados situados sobre dicha segunda membrana (4) por dicha abertura auxiliar (232) y entonces la etapa de hacer pasar el lisado así formado desde el segundo compartimento (227) al tercer compartimento (228) a través de dicha segunda membrana (4).
- 25
- 2.- Un método según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar una unidad de preparación (201) cuyo cuerpo (202) comprende una primera parte (209) a la que está fijada dicha primera membrana (3) y una segunda parte (210) a la que está fijada dicha segunda membrana (4), cuyas partes pueden separarse una de otra.
- 30
- 3.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que las etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas (3, 4) se realizan colocando dicho tercer compartimento (28) a presión reducida.
- 35
- 4.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que las etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas (3, 4) se realizan colocando dicho primer compartimento (26) a presión aumentada.
- 40
- 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que las etapas de hacer pasar dicho líquido a través de dichas membranas (3, 4) se realizan centrifugando dicha unidad de preparación (201),
- 6.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación (201) comprende la etapa de seleccionar como dicha primera membrana (3), una membrana de diámetro de poro mayor que 1  $\mu\text{m}$ .
- 45
- 7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar como dicha segunda membrana (4), una membrana de diámetro de poro menor que 0,65  $\mu\text{m}$ .
- 8.- Un método según la reivindicación 7, caracterizado por que la etapa de procurar una unidad de preparación comprende la etapa de seleccionar como dicha segunda membrana, una membrana de diámetro de poro menor que 0,1  $\mu\text{m}$ .
- 50
- 9.- Una unidad para preparar una muestra adecuada para la implementación del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende un cuerpo generalmente tubular (202) en el interior del cual están fijadas una primera (3) y una segunda (4) membranas, cuyo cuerpo (202) tiene una abertura (207) para introducir dicho líquido, un primer compartimento (226) entre dicha abertura de introducción (207) y dicha primera membrana (3), un

segundo compartimento (227) entra dichas primera (3) y segunda (4) membranas, y un tercer compartimento (228) sobre el lado opuesto de dicha segunda membrana (4) desde dicha primera membrana (3), cuya primera membrana (3) tiene un primer diámetro de poro predeterminado y cuya segunda membrana (4) tiene un segundo diámetro de poro predeterminado menor que dicho primer diámetro de poro predeterminado de dicha primera membrana (3);  
5 estando adaptada dicha unidad para pasar un volumen predeterminado de dicho líquido desde el primer al segundo compartimento por dicha primera membrana (3) y hacer pasar luego todo el filtrado, que ha alcanzado de este modo el segundo compartimento (227), desde el segundo al tercer compartimento a través de dicha segunda membrana (4) con objeto de recoger dicha muestra sobre dicha segunda membrana (4), cuyo cuerpo comprende también medios (232) para recuperar dicha muestra recogida de este modo sobre dicha segunda membrana (4),  
10 caracterizado por que dichos medios de recuperación comprenden una abertura (232) capaz de ser destapada, formada en dicho cuerpo (202), y que comunica con dicho segundo compartimento (227).

10.- Una unidad según la reivindicación 8, caracterizada por que dicha primera membrana (3) es permeable al aire cuando está húmeda.

15 11.- Una unidad según la reivindicación 10, caracterizada por que los poros de dicha primera membrana (3) tienen un diámetro mayor que 1  $\mu\text{m}$ .

12.- Una unidad según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que los poros de dicha segunda membrana (4) tienen un diámetro menor que 0,65  $\mu\text{m}$ .

13.- Una unidad según la reivindicación 12, caracterizada por que los poros de dicha segunda membrana (4) tienen un diámetro menor que 0,1  $\mu\text{m}$ .

20 14.- Una unidad según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada por que dicho cuerpo (202) comprende una primera parte (209) a la que está fijada dicha primera membrana (3) y una segunda parte (210) a la que está fijada dicha segunda membrana (4).

15.- Una unidad según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada por que dicho cuerpo (202) comprende un receptáculo (230) que delimita dicho tercer compartimento (228).

25 16.- Una unidad según la reivindicación 15, caracterizada por que dicho receptáculo (230) puede separarse.

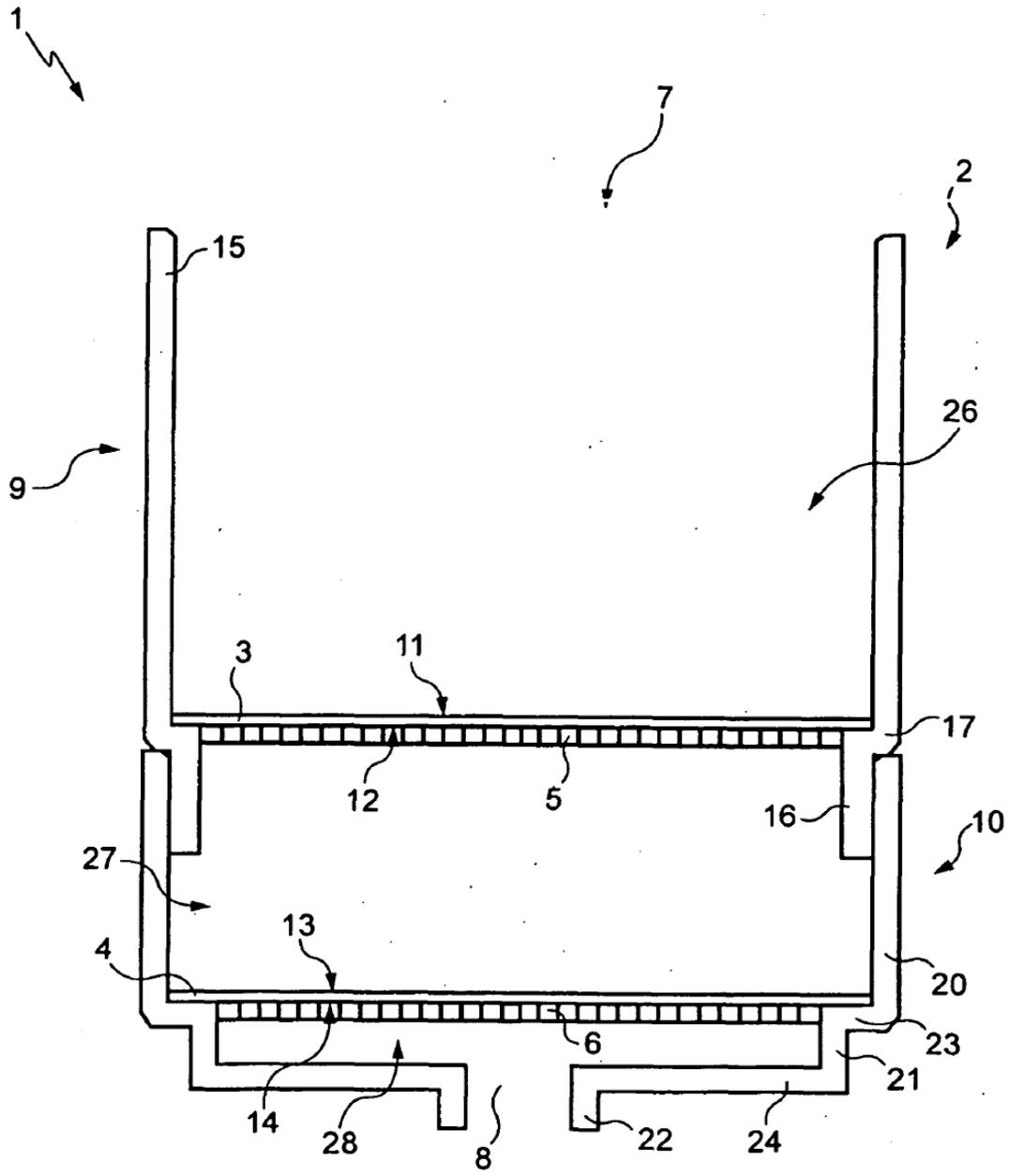


Fig. 1

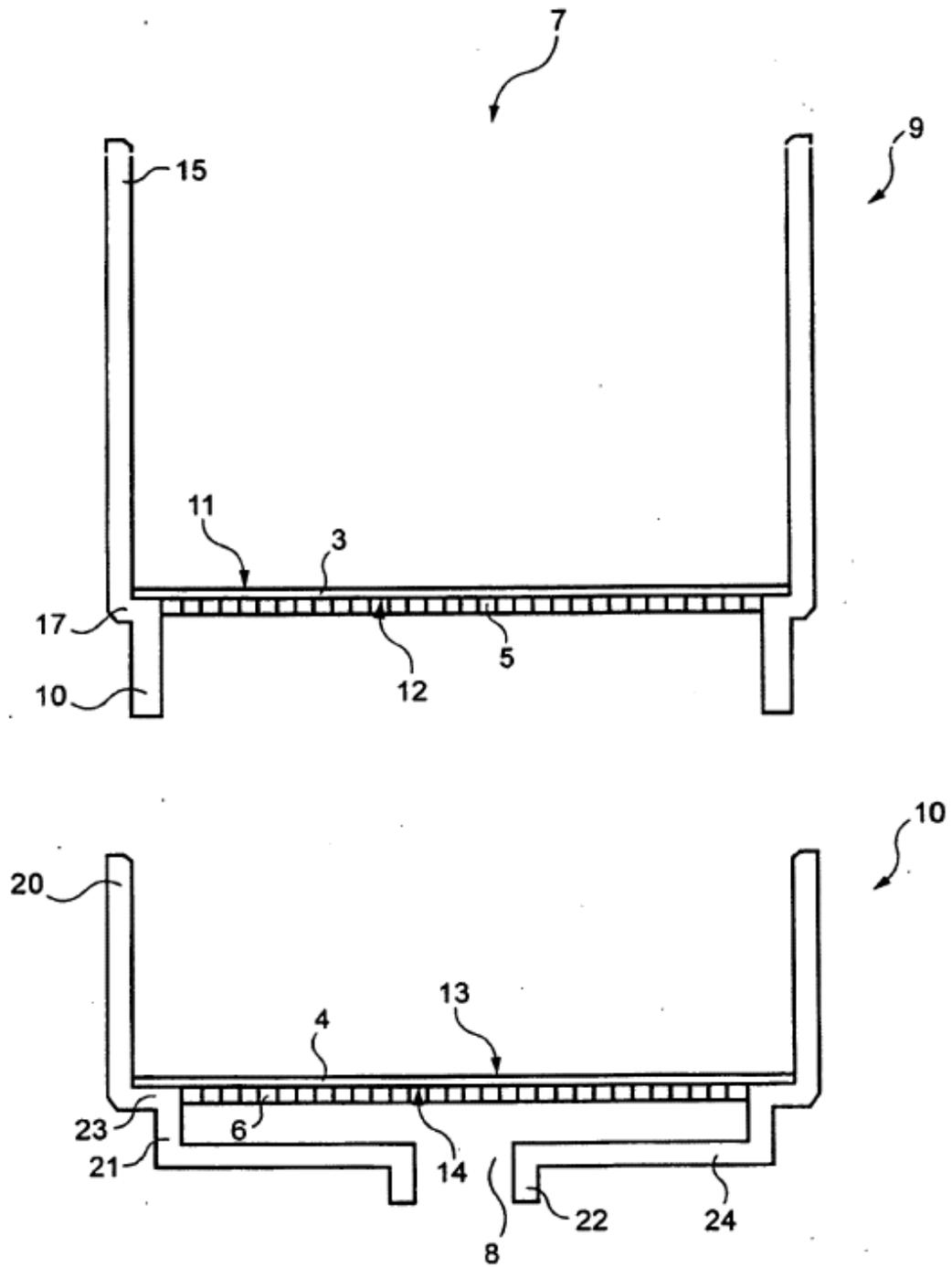


Fig. 2

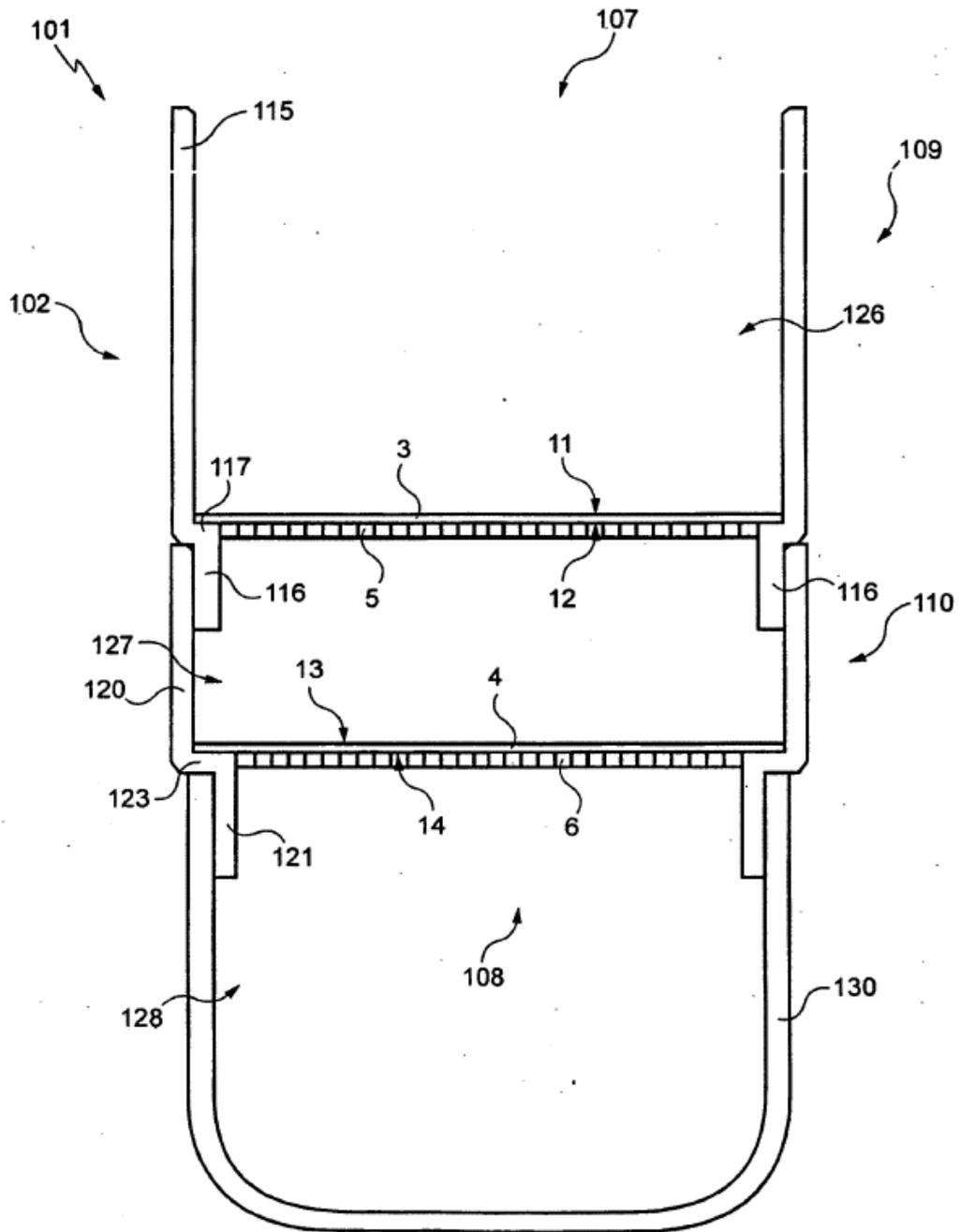


Fig. 3

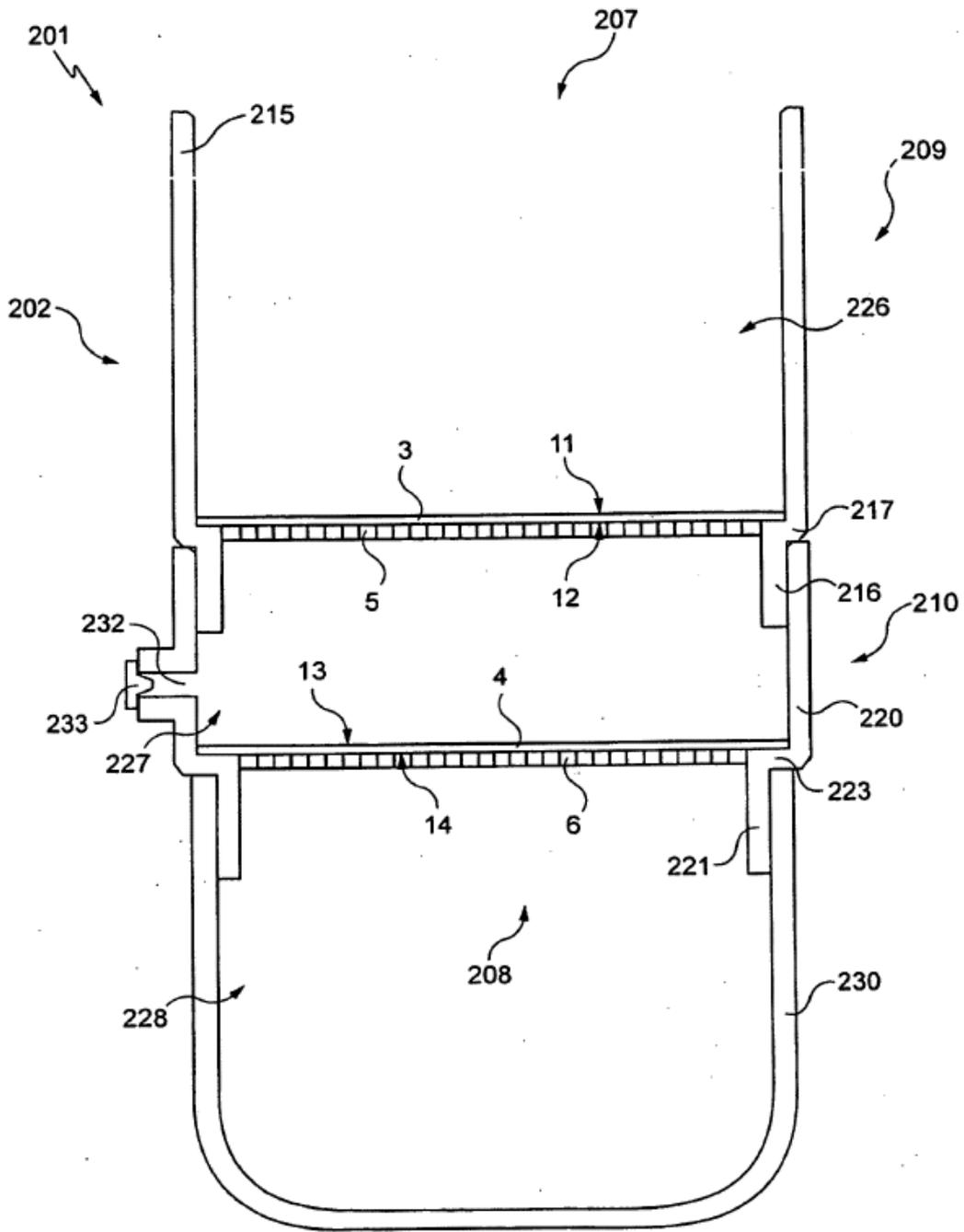


Fig. 4