

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 355**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2006 E 06778860 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 1907527**

54 Título: **Dispositivo de preparación de una muestra de fluido biológico para un análisis bacteriológico**

30 Prioridad:

12.07.2005 FR 0552151

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

10.05.2016

73 Titular/es:

**HEMOSYSTEM (100.0%)
45, COURS GOUFFE
13006 MARSEILLE, FR**

72 Inventor/es:

**BESSON-FAURE, ISABELLE;
HERMET, JEAN-PIERRE y
RIBAUT, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 355 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

Dispositivo de preparación de una muestra de fluido biológico para un análisis bacteriológico

La presente invención se refiere al campo de la preparación de muestras de fluido biológico, de manera más particular sangre, para su análisis biológico.

5 La presente invención se refiere de manera más particular al campo de la microbiología y propone un procedimiento y un dispositivo para muestrear y tratar un volumen de sangre total para un análisis bacteriológico.

10 El procedimiento y el dispositivo descritos en la presente invención están destinados a extraer una muestra de sangre total, a reducir/eliminar las células eucariotas/humanas presentes en esta muestra y a aislar/concentrar las células procariotas/microorganismos eventualmente presentes en esta muestra para su detección y/o identificación mediante unos métodos específicos. Entre estos métodos, se pueden citar 1) los métodos de biología celular como el cultivo en placa de Petri, las técnicas de detección directa en microscopía y 2) los métodos de biología molecular de análisis del ADN y del ARN con, por ejemplo, la técnica denominada RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) y la técnica de amplificación de ADN o PCR (*polymerase chain reaction*) con, en particular, el método de PCR en tiempo real.

15 La sangre normalmente es estéril. Es fundamental poder identificar una eventual bacteriemia, afectando el retraso en la atención del paciente y, por lo tanto, el retraso en el diagnóstico a la frecuencia de muertes. El método que permite la detección y la identificación de las bacterias presentes en la sangre es, por lo tanto, esencial. En la actualidad, se utilizan unas técnicas de microbiología clásica que comprenden sucesivamente un hemocultivo, una primera identificación visual tras una tinción de Gram y a continuación un subcultivo en un medio sólido para una identificación secundaria y un antibiograma. Los resultados se obtienen, por lo general, en varios días. Los otros métodos empleados de tipo biología molecular solo permiten identificaciones precisas relacionadas con indicaciones particulares, por ejemplo la detección del estreptococo de grupo B durante el embarazo.

20 Los resultados de las pruebas biológicas realizadas en unas muestras de sangre dependen mucho de las condiciones pre-analíticas. En efecto, el tipo de extracción realizada (venosa o arterial), el anticoagulante utilizado, el material disponible influyen de forma importante en la calidad de los resultados. Además, para un análisis bacteriológico, las condiciones de prueba deben recurrir a unos procedimientos estrictos con el fin de evitar cualquier contaminación durante la manipulación, que conduzca a unos resultados llamados "falsos positivos", por los organismos presentes en el entorno. Estas condiciones deben entonces ser aun más drásticas para los análisis de biología molecular que recurren a reactivos altamente sensibles a las interferencias naturalmente presentes en el entorno. La variabilidad de las condiciones pre-analíticas unida a la multiplicidad de los métodos de detección/identificación hace de la prueba de sangre bacteriológica en biología molecular un parámetro muy difícil de estandarizar. En efecto, la preparación de las muestras para un análisis bacteriológico recurre habitualmente a unas técnicas "caseras", no estandarizadas, que hay que realizar en un entorno estéril con material específico para esta aplicación. El dispositivo descrito en la presente invención es una forma de estandarización. Es un sistema cerrado sin riesgo de contaminación de la muestra. La extracción se hace directamente en el tubo de extracción mediante aspiración sin abrir este y todas las etapas de preparación se realizan en el interior del dispositivo sin romper la esterilidad.

25 En el laboratorio, la PCR permite por lo general una detección mediante la amplificación de algunas copias de genoma bacteriano en una muestra. Es un análisis rápido que se lleva a cabo en unas pocas horas y que también permite conocer la especie de la bacteria en cuestión. Sin embargo, la utilización de los métodos de biología molecular está limitada en parte por la presencia de numerosos factores en la sangre que reducen la eficacia de la amplificación como las Inmunoglobulinas G cuya concentración plasmática es de entre 8 y 18 g/litro, el grupo hemo, la hemoglobina, principal componente de los glóbulos rojos y la lactoferrina, presente en los leucocitos, las altas concentraciones de ADN eucariota que vienen de las células nucleadas sanguíneas como los leucocitos. Por ello, los volúmenes analizados son pequeños para limitar la cantidad de inhibidores: con los métodos actualmente disponibles en el mercado el volumen de muestra tratable es de 100 μ l y raramente sobrepasa los 200 μ l en función de los kits. En el caso de las bacteriemias sintomáticas o no sintomáticas la carga bacteriana es más pequeña y puede ser inferior a 1 bacteria por mililitro de sangre. En este caso, está estadísticamente demostrado que 200 μ l es un volumen insuficiente para detectar estas bajas concentraciones. El dispositivo descrito en la presente invención permite reducir los factores de inhibición plasmáticos y celulares que hacen posible una extensión de volumen hasta 30 15 ml de sangre total y, por ello, un aumento de la sensibilidad del método.

35 Con el fin de superar los factores de inhibición celular, los métodos PCR se llevan a cabo tradicionalmente en suero procedente de la centrifugación de la sangre total. En efecto, durante una centrifugación, los elementos figurados de la sangre se concentran en el precipitado mientras que los compuestos solubles como el ADN y el ARN libres se mantienen en el sobrenadante que se extrae para el análisis. Este procedimiento no se puede aplicar a las bacterias ya que su densidad es comparable a las de los corpúsculos sanguíneos y también se encuentran en el precipitado celular.

En la patente US-6 869 769, se describe un dispositivo, un método y un kit para separar los corpúsculos sanguíneos (leucocitos, glóbulos rojos, plaquetas) de los ARN/ADN virales o ADN bacterianos en un soporte sólido para un análisis PCR. Este procedimiento solo se puede aplicar en volúmenes de sangre extremadamente reducidos del orden de una gota y no se puede aplicar a la búsqueda y/o identificación de los microorganismos en el caso de bacteriemia en el que la carga de microorganismos es muy pequeña.

La patente US-5 958 257 da a conocer un dispositivo de separación de un compuesto de la sangre que comprende un recipiente provisto de una cámara dentro de la que se puede desplazar un pistón entre una posición de apertura y una posición de obturación, comprendiendo dicha cámara una zona de separación y un medio de introducción de un fluido dentro de dicha cámara, estando dicho medio de introducción dispuesto en la parte superior de la cámara, y comprendiendo dicho pistón un medio de obturación que coopera con la zona de separación de modo que define un volumen superior y un volumen inferior a ambos lados de dicha zona.

La invención pretende resolver los inconvenientes y las carencias del estado de la técnica proponiendo un dispositivo y un procedimiento que facilita el análisis rápido de una muestra de fluido biológico en el campo de la microbiología de modo eficaz, estandarizado y simple, con una exposición reducida del usuario con respecto a los riesgos biológicos. Este procedimiento y este dispositivo están especialmente adaptados para una utilización rutinaria en el sector hospitalario para la preparación de una muestra de sangre para un análisis bacteriológico, en particular de biología molecular, que permite que el biólogo y el médico accedan rápidamente a un resultado.

Para ello y según un primer aspecto, la invención se refiere a un dispositivo de preparación de una muestra de fluido biológico para su análisis bacteriológico que comprende un recipiente provisto de una cámara dentro de la que se puede desplazar un pistón entre una posición de apertura y una posición de obturación, comprendiendo la cámara una zona de separación y un medio de introducción de un fluido dentro de dicha cámara, estando dicho medio de introducción dispuesto en la parte superior de la cámara y comprendiendo el pistón un medio de obturación que coopera con la zona de separación de modo que se define un volumen superior y un volumen inferior a ambos lados de dicha zona, comunicando el volumen superior y el volumen inferior entre sí cuando el pistón está en la posición de apertura y quedando aislados uno del otro de forma estanca cuando el pistón está en la posición de obturación, y caracterizándose dicho dispositivo porque la zona de separación comprende un cuello de botella, extendiéndose el volumen inferior bajo dicho cuello de botella, estando el medio de obturación previsto para taponar dicho cuello cuando el pistón está en la posición de obturación de modo que se aísla el volumen inferior del volumen superior.

El dispositivo descrito en la presente invención es el vínculo entre la muestra de sangre que hay analizar y la plataforma de análisis, forma parte de una solución global y estandarizada de detección rápida de las bacterias en la sangre. El dispositivo comprende diferentes volúmenes independientes pero unidos que pueden contener soluciones de reactivos listos para usar.

Durante su utilización en el hospital, el dispositivo permite realizar diferentes etapas secuenciales e integradas.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una muestra de fluido biológico para su análisis bacteriológico que utiliza un dispositivo de preparación como se ha descrito con anterioridad, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- introducir el fluido biológico dentro de la cámara, estando el pistón en la posición de apertura;
- tras la sedimentación del fluido biológico, desplazar el pistón a su posición de obturación de modo que se separa el precipitado de sedimento del sobrenadante, encontrándose dicho precipitado en el volumen inferior y encontrándose dicho sobrenadante en el volumen superior;
- mezclar el sobrenadante con una solución de reactivos prevista para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en dicho sobrenadante;
- extraer dicho sobrenadante para su análisis bacteriológico.

De manera más particular, el dispositivo permite extraer o recibir, de forma estéril, una muestra de entre 1 ml mínimo y 15 ml máximo de sangre total procedente de un tubo de extracción de sangre estándar extraído en anticoagulante.

El dispositivo asociado al tubo de extracción permite la extracción de la muestra mediante un sistema de aspiración (fuelle, pera, pistón).

El dispositivo permite una incubación dentro de la cámara durante un tiempo que va de 20 minutos a 60 horas, tiempo durante el que los glóbulos rojos sedimentan en el precipitado y los microorganismos se desarrollan. Esta cámara puede llenarse previamente con una primera solución de reactivos que aceleran la sedimentación de los glóbulos rojos y/o el desarrollo de los microorganismos.

El dispositivo permite extraer o aislar entre 6 y 20 ml del sobrenadante que resulta de la etapa anterior sin extraer el precipitado presente en el volumen inferior.

El dispositivo permite la mezcla de este sobrenadante con una segunda solución de reactivos dentro de la cámara o tras su transferencia a una segunda cámara. El conjunto se incuba con agitación durante entre 30 minutos y 6 horas, tiempo durante el que las plaquetas se agregan y los microorganismos se desarrollan.

El dispositivo permite la filtración de la totalidad de la muestra resultante en un filtro de jeringa con una porosidad superior a 5 μm con sistema de conexión "luer" (entrada hembra "luerlock", salida macho "luer" o "luer-lock") para retener los agregados/acúmulos plaquetarios y los glóbulos blancos residuales y, en línea, un soporte de membrana con sistema de conexión de entrada "luer-lock" hembra constituido por dos partes anidadas y desmontables que contienen una membrana de filtro de entre 0,2 μm y 1 μm de porosidad que retiene las bacterias. En la patente US-2004/0208796 se describe un ejemplo de soporte de membrana.

Las bacterias aisladas en esta última membrana pueden entonces ser objeto de una preparación para un análisis de biología molecular. Tradicionalmente, se aplica un protocolo de lisis física o química o físico-química para romper las células y recuperar el material genético que hay que analizar. La ventaja del tratamiento previo de la muestra por medio del procedimiento y dispositivo descritos en esta invención es quitar los microorganismos de interés de todos los factores de interferencia de las pruebas, factores solubles plasmáticos o factores celulares. Para ello, las diferentes cámaras del dispositivo pueden contener unas soluciones de reactivos listas para usar:

La primera solución, dentro de la cámara, está compuesta por reactivos que aceleran la sedimentación de los glóbulos rojos y el crecimiento de los microorganismos:

- Medio de cultivo para microorganismos;
- Polímeros;
- Aglutininas;
- Agua osmotizada.

La segunda solución dentro de otra cámara (o añadida a la cámara del dispositivo), está compuesta por reactivos que permiten la agregación de las plaquetas y el crecimiento de las bacterias:

- Medio de cultivo para microorganismos;
- Agente de agregación plaquetaria.

Se mostrarán otros objetos y ventajas de la invención durante la descripción que viene a continuación, hecha en referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 es una representación esquemática de lado del dispositivo de acuerdo con la invención.

La figura 2 es una representación esquemática en sección en el eje A-A de la figura 1.

En referencia a las figuras, se describe un dispositivo 1 de preparación de una muestra de fluido biológico que consta de tres piezas principales ensambladas que definen un recipiente. La parte 2 superior del dispositivo está asociada a la parte 3 inferior para formar una cámara 4 cerrada en su base mediante un pistón 5 que se puede desplazar entre una posición de apertura y una posición de obturación en la parte 3 inferior del dispositivo y que constituye también la base 6 del dispositivo. La cámara 4 comprende una zona 7 de separación. El pistón 5 comprende un medio 8 de obturación que coopera con la zona 7 de separación de modo que define un volumen 9 superior y un volumen 10 inferior a ambos lados de la zona 7. El volumen 9 superior y el volumen 10 inferior comunican entre sí cuando el pistón 5 está en la posición de apertura y quedan aislados no del otro de forma estanca cuando el pistón 5 está en la posición de obturación, como se representa en la figura 2.

El pistón 5 comprende una varilla 11 que se extiende dentro del volumen 10 inferior, extendiéndose dicho volumen inferior a ambos lados de la varilla 11. La varilla 11 comprende una protuberancia 12 que forma un medio 8 de obturación prevista en su parte extrema libre.

La parte 2 superior y la parte 3 inferior están ensambladas por medio de un tornillo 13 o pueden estar pegadas. La parte 3 inferior comprende una ranura 14 de guiado y el pistón 5 comprende una pestaña 19, estando dicha pestaña dispuesta dentro de dicha ranura. El pistón 5 se encuentra en la posición de obturación cuando la pestaña 19 está dispuesta en una de las partes extremas de la ranura 14, como se representa en las figuras, y en la posición de apertura cuando la pestaña 19 está dispuesta en la otra parte extrema de la ranura 14.

De manera ventajosa, el dispositivo es de vidrio siliconado o de un material plástico no adherente para las células, por ejemplo, de polipropileno o de poliacrílico de tipo polimetacrilato de metilo. El material del dispositivo debe ser compatible con una esterilización, de preferencia mediante irradiación β o γ . La protuberancia 12 del obturador 8 es de manera preferente de elastómero de modo que garantiza una obturación estanca al adaptarse al diámetro del dispositivo.

Las diferentes etapas del procedimiento en relación con la estructura del dispositivo se detallan a continuación. Durante la primera etapa, la muestra se introduce por la parte 2 superior del dispositivo por medio de unos medios de introducción del fluido dentro de la cámara 4. Los medios de introducción están, por ejemplo, formados por una conexión 15 Luer. Un cuerpo de bomba equipado con una aguja protegida capaz de perforar los tapones de caucho de los tubos de extracción se enrosca sobre la conexión 15 Luer en la parte superior del dispositivo. El cuerpo de bomba se mantiene dentro de un elemento 16 de recepción asociado a la parte superior del recipiente. El elemento de recepción está, por ejemplo, formado por un faldón con un diámetro superior al diámetro del cuerpo de bomba

que acoge el tubo. El faldón está atravesado por dos ventanas 17 que permiten la manipulación (enroscado - desenroscado) de los objetos que se colocan sobre el Luer 15. El tubo de extracción que contiene la sangre se coloca con el tapón hacia abajo y se guía sobre la aguja dentro del cuerpo de bomba. Al ejercer una presión vertical sobre el tubo, se atraviesa el tapón de caucho y la aguja se encuentra en contacto con el líquido biológico. Se crea una aspiración del contenido del tubo al accionar el pistón 5 tirando de la base 6. Este pistón 5 tiene un recorrido definido por medio de la pestaña que se desliza dentro de la ranura 14 lo que permite la aspiración del líquido. Algunas idas y vueltas del pistón (movimientos de arriba a abajo) permiten el llenado de la cámara 4 y, en el caso de la presencia de una primera solución de reactivos, la mezcla de la sangre con la primera solución de reactivos. El pistón 5 queda inmovilizado en la posición de apertura por medio de la pestaña 19 retenida en la parte inferior de la ranura 14. El dispositivo se pone entonces sobre la base 6 durante un tiempo que va desde 20 minutos a 60 horas. De manera ventajosa, el dispositivo se pone dentro de un recinto termostático entre 30 °C y 37 °C con el fin de facilitar el crecimiento de los microorganismos. Durante este periodo de incubación, los glóbulos rojos sedimentan en el volumen 10 inferior. El precipitado es más compacto e irreversible cuando la sangre se ha mezclado y se ha incubado con la primera solución de reactivos que contienen aglutininas.

La zona 7 de separación comprende un cuello 18 de botella cuya forma facilita la sedimentación antes de su paso al volumen 10 inferior. El volumen 10 inferior se extiende bajo el cuello 18 de botella y el medio 8 de obturación está previsto para taponar dicho cuello 18 cuando el pistón 5 está en la posición de obturación de modo que aísla el volumen 10 inferior del volumen 11 superior. El cuello 18 presenta, por ejemplo, una forma anular sustancialmente troncocónica que se extiende dentro del volumen 4 superior. Esta forma garantiza una aglutinación máxima antes de su paso al volumen 10 inferior.

La utilización de aglutininas permite obtener un precipitado denso con exclusión de los líquidos y una menor pérdida de bacterias en el interior de la red de glóbulos rojos sedimentados. Después de la incubación, el pistón 5 se desbloquea de su posición de apertura mediante la rotación de la base 6 y se empuja delicadamente de forma que la pestaña 19 se deslice dentro de la ranura 14 hasta su posición de obturación. El pistón 5 queda inmovilizado en la posición de obturación por medio de la pestaña 19 retenida en la parte extrema de la ranura 14. El pistón 5 arrastra al medio 8 de obturación que taponar de forma hermética el cuello 18 aislando en el volumen 10 inferior el precipitado de glóbulos rojos. El volumen 9 superior contiene la parte plasmática, las plaquetas de sangre, los glóbulos blancos y las bacterias. Cuanto más largo es el tiempo de incubación más alta es la concentración de bacterias. La siguiente etapa se caracteriza por la introducción de una segunda solución de reactivos que presentan unas propiedades de agregación plaquetaria. El cuerpo de bomba situado en la primera etapa sobre el elemento 16 de recepción se desenrosca manualmente, por medio de las ventanas 17 que permiten un acceso directo al cuerpo de bomba, y se elimina. Una jeringa con conector Luer y que contiene la segunda solución de reactivos se coloca y se enrosca en su lugar. Se introduce la solución en el volumen 9 superior. Se aplica una agitación mediante el vuelco del dispositivo lo que permite que la solución se mezcle con el sobrenadante procedente de la etapa anterior. El dispositivo 1 se pone entonces horizontalmente sobre un agitador de balanceo, en la perpendicular del eje de agitación durante entre 30 minutos y 6 horas. De manera ventajosa, el agitador que lleva el dispositivo se coloca dentro de un recinto termostático entre 30 °C y 37 °C con el fin de facilitar el crecimiento de los microorganismos. Durante este periodo de incubación, las plaquetas se agregan dentro del volumen 9 superior. Cuanto más largo es el tiempo de incubación, más alta es la concentración de bacterias. La siguiente etapa se puede realizar de diferentes formas:

De acuerdo con una primera realización, al final de la incubación, se da la vuelta al dispositivo, con el pistón 5 hacia arriba y el faldón hacia abajo, la jeringa en su lugar, y se desenrosca ligeramente un tapón 19 de una toma 20 de aire, y se aspira el contenido del volumen 9 superior dentro de la jeringa, devolviéndose al dispositivo a su posición correcta, con el pistón 5 hacia abajo y el faldón hacia arriba, y se desenrosca entonces la jeringa, se coloca un primer filtro con una porosidad superior a 5 μm mediante conexión Luer sobre dicha jeringa conectado a su vez en línea a un soporte de membrana que contiene una membrana, segundo filtro, de entre 0,2 μm y 1 μm de porosidad, el contenido de la jeringa pasa secuencialmente a través del primer filtro que retiene los agregados plaquetarios y los glóbulos blancos, y del segundo filtro que retiene los microorganismos. Se abre el soporte del segundo filtro y se recupera la membrana para el análisis de los microorganismos retenidos. Se da un ejemplo de soporte de filtro en la patente US-2004/0208796.

De acuerdo con una segunda realización, al final de la incubación, se desenrosca la jeringa situada en la anterior etapa y se insertan un primer filtro y un segundo filtro en línea en su lugar a la altura de la conexión 15 Luer protegida por el faldón, se pone un primer filtro con una porosidad superior a 5 μm directamente en contacto con el faldón y se inserta un segundo filtro de entre 0,2 μm y 1 μm de porosidad dentro de un soporte (ver ejemplo en el documento US-2004/0208796) y se ubica en línea con el primer filtro, se da la vuelta al dispositivo, con el pistón 5 hacia arriba y el faldón hacia abajo, y se conecta el soporte de filtro a una fuente de vacío, se desenrosca ligeramente el tapón 19 de la toma 20 de aire, se aplica el vacío, el contenido del volumen 9 superior pasa secuencialmente a través del primer filtro que retiene los agregados plaquetarios y los glóbulos blancos, y del segundo filtro que retiene los microorganismos. El dispositivo y el primer filtro se sueltan del soporte de filtro, se abre el soporte del segundo filtro y se recupera la membrana para el análisis de los microorganismos retenidos.

De manera ventajosa, se puede extraer 1 ml de filtrado al final de la etapa de filtración, para ello, se le da la vuelta al dispositivo, con el pistón 5 hacia arriba, el faldón hacia abajo y la jeringa en su sitio, se desenrosca ligeramente el

tapón 19 de la toma 20 de aire y se aspira una parte del volumen contenido en el volumen 9 superior dentro de la jeringa, se devuelve al dispositivo a su posición correcta, con el pistón 5 hacia abajo y el faldón hacia arriba, y se desenrosca entonces la jeringa y puede llevarse a cabo la etapa de análisis. Este volumen de filtrado contiene los eventuales microorganismos integrados y se podrá utilizar como muestra destinada al antibiograma.

- 5 El interés del procedimiento y del dispositivo descritos en la presente invención es aislar y concentrar los microorganismos de una muestra de sangre en unas pocas horas. Se proponen dos protocolos, en el primero, la primera incubación dura 20 minutos y la segunda incubación dura 4 horas a 35-37 °C, y en el segundo protocolo, llamado "protocolo noche" la primera incubación dura más de 12 horas a 35-37 °C y la segunda incubación dura 30 minutos. Los microorganismos se aíslan y se concentran en un tiempo mínimo de 4 horas y 20 minutos a partir de una muestra de entre 1 y 15 ml de sangre total en una membrana de filtración. Esta membrana se puede tratar entonces, por ejemplo, para un análisis de biología molecular.

Los ejemplos propuestos se han realizado con unas soluciones de reactivos:

Primera solución: 9 milímetros dentro de la cámara 4, está compuesta por reactivos que aceleran la sedimentación de los glóbulos rojos y el crecimiento de las bacterias:

- 15
- TSB, Corazón-Cerebro (25 %, 75 %);
 - PEG 35.000 al 1 % (p/v);
 - lectina 6,66 µg/ml;
 - agua osmotizada.

Segunda solución: 1,2 milímetros añadidos dentro de la cámara 4, está compuesta por reactivos que permiten la agregación de las plaquetas y el crecimiento de las bacterias:

- 20
- TSB, Corazón-Cerebro (25 %, 75 %);
 - CD9 45 mg/litro.

Ejemplo 1: Eliminación de los glóbulos rojos y de las plaquetas

25 Se extraen entre 3 y 5 mililitros de sangre total del dispositivo 1 que contiene 9 mililitros de la primera solución de reactivos como se ha descrito con anterioridad. Se pone el dispositivo 30 minutos sobre su base 6 en la posición vertical a temperatura ambiente. Se aísla el precipitado de glóbulos rojos (GR) formado mediante una acción a la altura del pistón 5. Se recupera el sobrenadante (SN). Se lleva a cabo un recuento de los glóbulos rojos y de las plaquetas en el sobrenadante (GR en SN y PLT en SN) con un contador celular (Micros 60, ABX, Francia). Para una de las muestras, el procedimiento prosigue mediante la adición de la segunda solución de reactivos, incubación con agitación durante la noche (aproximadamente 16 horas) y a continuación filtración superior a 5 µm de todo el sobrenadante. Se lleva a cabo un recuento de las plaquetas (PLT) en el filtrado con un contador celular (Micros 60, ABX, Francia).

35 Se resumen los resultados en la tabla 1. El número de GR en la muestra (GR en la muestra) se calcula partiendo de una concentración de GR teórica de $4 \times 10^6 / \mu\text{l}$. Del mismo modo, el número de PLT (PLT en la muestra) se calcula a partir de un valor teórico de $300 \times 10^3 / \mu\text{l}$. Después de la sedimentación y el aislamiento de los GR, el número de glóbulos rojos residuales en el sobrenadante se divide por 50 y 100, y el número de plaquetas residuales por 5. Después de la agregación plaquetaria y la filtración, este número se divide por 10.

En este ejemplo, el procedimiento y el dispositivo permiten una reducción de aproximadamente 2 LOG de glóbulos rojos y de aproximadamente 1 LOG de plaquetas.

40 Ejemplo 2: recuperación de los microorganismos

Se contamina de forma experimental una muestra de sangre total con 4 cepas bacterianas: *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (EC) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA) con aproximadamente 100 bacterias/ml. Se introduce un volumen de sangre dentro del dispositivo 1 y se incuba dentro de la cámara 4 con 9 ml de la primera solución de reactivos. Se pone el dispositivo 30 minutos sobre su base 6 en la posición vertical a temperatura ambiente. Se aísla el precipitado de glóbulos rojos formado mediante una acción a la altura del pistón 5. Se recupera el sobrenadante (SN). El procedimiento prosigue mediante la adición de la segunda solución de reactivos y la incubación con agitación durante 4 horas dentro de un recinto termorregulado a 35-37 °C. Se realiza un recuento de bacterias en una placa de Petri al comienzo de la incubación a 35-37 °C, a T0, y después de 2 horas de incubación a T2H, y después de 4 horas de incubación a T4H. Las colonias en las placas de Petri se cuentan entre 24 y 48 horas después de su depósito.

Se presentan los resultados en la tabla 2. La incubación de 4H permite un crecimiento significativo de las bacterias cuyo número se multiplica por 25 para SE que se conoce como una bacteria de crecimiento lento, hasta 9.000 para EC que se conoce como una bacteria de crecimiento rápido. Estas concentraciones son compatibles con un método de detección de biología molecular.

55

ES 2 569 355 T3

Tabla 1

	Vol. de muestra de sangre (ml)	GR en la muestra	PLT en la muestra	SN (ml)	GR en el SN	PLT en el SN	PLT en el filtrado
	4	16×10^9	12×10^8	7	$2,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	
	4	16×10^9	12×10^8	7	$2,8 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	
	5	2×10^{10}	15×10^8	> 7	2×10^8	$7,4 \times 10^8$	
	4,5	18×10^9	14×10^8	> 7	2×10^8	$6,2 \times 10^8$	
	3	12×10^9	9×10^8	7	2×10^8	$1,2 \times 10^8$	
	3,5	14×10^9	11×10^8	7	2×10^8	$3,5 \times 10^8$	10^8
	4	16×10^9	12×10^8	7	2×10^8	$3,3 \times 10^8$	

Tabla 2

	SE	SA	EC	PA
T0	40	60	130	450
T2H	220	350	1.450	1.020
T4H	1.000	6.000	1.190.000	49.000

5 Resultados expresados en número de colonias/ml de sobrenadante.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de preparación de una muestra de fluido biológico para su análisis bacteriológico que comprende un recipiente provisto de una cámara (4) dentro de la que se puede desplazar un pistón (5) entre una posición de apertura y una posición de obturación, estando dicho dispositivo **caracterizado porque** la cámara (4) comprende una zona (7) de separación y un medio (15, 16) de introducción de un fluido dentro de dicha cámara, estando dicho medio de introducción dispuesto en la parte (2) superior de la cámara (4) y **porque** el pistón (5) comprende un medio (8) de obturación que coopera con la zona (7) de separación de modo que se define un volumen (9) superior y un volumen (10) inferior a ambos lados de dicha zona, comunicando el volumen (9) superior y el volumen (10) inferior entre sí cuando el pistón (5) está en la posición de apertura y quedando aislados uno del otro de forma estanca cuando el pistón (5) está en la posición de obturación, y estando dicho dispositivo **caracterizado porque** la zona (7) de separación comprende un cuello (18) de botella, extendiéndose el volumen (10) inferior bajo dicho cuello de botella, estando el medio (8) de obturación previsto para taponar dicho cuello cuando el pistón (5) está en la posición de obturación de modo que aísla el volumen (10) inferior del volumen (9) superior.
2. Dispositivo de preparación según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el cuello (18) presenta una forma anular sustancialmente troncocónica que se extiende dentro del volumen (9) superior.
3. Dispositivo de preparación según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el pistón (5) comprende una varilla (11) que se extiende dentro del volumen (10) inferior, extendiéndose dicho volumen inferior alrededor de dicha varilla, comprendiendo dicha varilla una protuberancia (12) que forma un medio (8) de obturación prevista en su parte extrema libre.
4. Dispositivo de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el recipiente comprende una ranura (14) de guiado, comprendiendo el pistón (5) una pestaña (19), estando dicha pestaña dispuesta dentro de dicha ranura, encontrándose el pistón (5) en la posición de obturación cuando la pestaña (19) está dispuesta en una de las partes extremas de la ranura (14) y en la posición de apertura cuando la pestaña (19) está dispuesta en la otra parte extrema de la ranura (14).
5. Dispositivo de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el medio de introducción del fluido está formado por un conector (15) Luer dispuesto por encima de la cámara (4) y destinado a recibir un recipiente que contiene el fluido a introducir dentro de dicha cámara.
6. Dispositivo de preparación según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el medio de introducción del fluido comprende, además, un elemento (16) de recepción del recipiente que contiene el fluido a introducir, estando dicho elemento asociado a la parte (2) superior del recipiente.
7. Dispositivo de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el recipiente comprende una parte (3) inferior y una parte (2) superior, estando la zona (7) de separación prevista en la parte (3) inferior, estando dichas partes asociadas entre sí de modo que forman la cámara (4).
8. Dispositivo de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la cámara (4) contiene una primera solución de reactivos prevista para acelerar la sedimentación del fluido biológico y el crecimiento de los microorganismos presentes en la muestra de fluido biológico a preparar.
9. Procedimiento de preparación de una muestra de fluido biológico para su análisis bacteriológico que utiliza un dispositivo (1) de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, estando dicho procedimiento **caracterizado porque** comprende las etapas que consisten en:
- introducir el fluido biológico dentro de la cámara (4), estando el pistón (5) en la posición de apertura;
 - tras la sedimentación del fluido biológico, desplazar el pistón (5) a su posición de obturación de modo que se separa el precipitado de sedimento del sobrenadante, encontrándose dicho precipitado en el volumen (10) inferior y encontrándose dicho sobrenadante en el volumen (9) superior;
 - mezclar el sobrenadante con una solución de reactivos prevista para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en dicho sobrenadante;
 - extraer dicho sobrenadante para su análisis bacteriológico.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado porque** el fluido biológico se mezcla con una primera solución de reactivos prevista para acelerar la sedimentación del fluido biológico y el crecimiento de los microorganismos presentes en la muestra de fluido biológico cuando se introduce dentro de la cámara (4).
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, **caracterizado porque** comprende una etapa de incubación y de filtración del sobrenadante después de la etapa de mezcla con una solución de reactivos prevista para favorecer el crecimiento de los microorganismos.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado porque** se introduce una cantidad comprendida entre 1 ml y 15 ml de fluido biológico dentro de la cámara (4).

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado porque** el fluido biológico es sangre total, siendo el precipitado de sedimento glóbulos rojos.

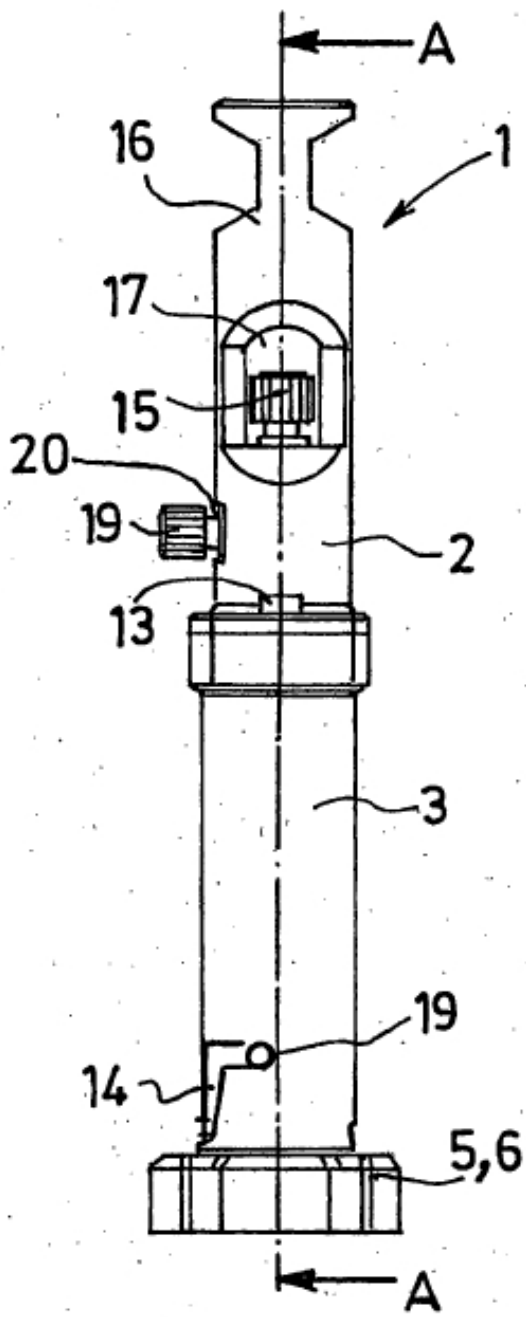


FIG.1

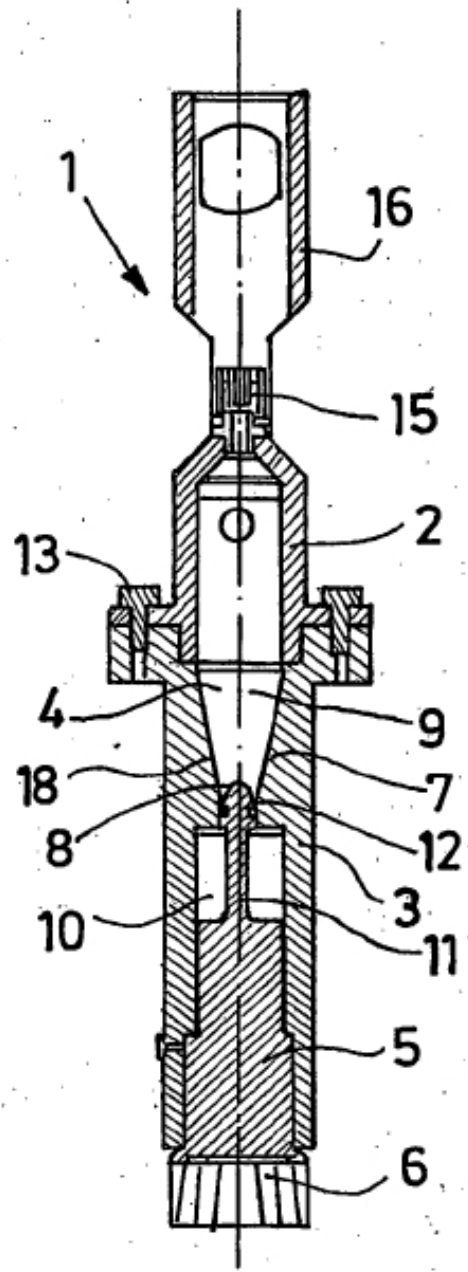


FIG.2