

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 606**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/US2013/057953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13763159 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2892648**

54 Título: **Método y aparato para detectar microorganismos**

30 Prioridad:

07.09.2012 US 201261698183 P
09.10.2012 US 201261711323 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

SHI, SONG;
YANG, MEI;
BERNDT, KLAUS, W.;
LOSADA, ROBERT, J.;
CRAWFORD, JAMIESON, W.;
ATTRI, RAVI;
BATTLES, CHRISTOPHER, A.;
BARTFELD, BENJAMIN, R. y
HIRES, GREGORY, R.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 606 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

Método y aparato para detectar microorganismos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La invención del asunto se relaciona con un método y un dispositivo para concentrar y detectar un microorganismo en una muestra de fluido. Más particularmente, esta invención se relaciona con un método y un dispositivo para concentrar microorganismos en un volumen confinado y detectar el crecimiento de los microorganismos en el volumen confinado.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 La sepsis es un problema significativo de salud y está caracterizada por un estado inflamatorio de todo el cuerpo, identificado como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, o SIRS, y por la presencia de una infección conocida o sospechada. Un paciente puede desarrollar esta reacción inflamatoria del sistema inmune en respuesta a los microorganismos de la sangre, la orina, los pulmones, la piel, u otros tejidos. Una de las causas principales de la sepsis es la infección del torrente sanguíneo (BSI). La BSI es más comúnmente diagnosticada mediante un hemocultivo en el que se permite ser incubada una muestra de sangre con un medio en una atmósfera controlada que promueve el crecimiento bacterial.

- 15 En ciertos casos, se cree que hay tan pocos como un solo microorganismo infeccioso presente en un mililitro de sangre infectada en el momento en que se recoge la muestra de un paciente. Los sistemas de hemocultivo automatizados actuales normalmente necesitan entre 12-24 horas para detectar la presencia de microorganismos infecciosos en una muestra de sangre, y necesitan hasta cinco días para descartar totalmente la presencia de microorganismos infecciosos. En los sistemas actuales, se necesitan otras 12-48 horas para identificar los microorganismos infecciosos realizando sub cultivos del hemocultivo positivo y realizando las pruebas de identificación y de susceptibilidad antimicrobiana. El retraso en el proceso de detección puede ser perjudicial para el curso de un tratamiento de un paciente, dando lugar a que los resultados lleguen demasiado tarde para alterar el curso de un tratamiento y la pérdida de vidas.

20 Por consiguiente, sería ventajoso acortar el tiempo requerido para detectar la presencia de microorganismos infecciosos en una muestra de sangre a menos de 24 horas.

Compendio de la invención

- 30 La presente invención está dirigida a un aparato y un método para microorganismos como se define en las reivindicaciones.

- 35 La presente invención reconoce que sería ventajoso concentrar un pequeño número de microorganismos infecciosos presentes en una muestra de sangre infectada en el momento de su recogida. La presente invención reconoce además que sería ventajoso proporcionar una parte concentrada de la muestra de sangre que contiene los microorganismos a un medio de crecimiento para su inoculación. Otras muestras de fluidos, tales como la orina, el esputo, la saliva, el fluido cerebrospinal, el fluido pleural, y otros fluidos corporales se podrían usar también en conjunción con la presente invención. Se ha de destacar también que la presente invención se puede usar para aún otras muestras de fluidos obtenidas a partir de muestras industriales, de sangre, y cosméticas para cultivos de microbiología. En los documentos US20100317106 A1 y US20100288694 A1 se describe un aparato para separar una muestra en sus componentes.

- 40 De acuerdo con una realización de la presente invención, un aparato para detectar la presencia de un microorganismo incluye un contenedor de recogida de muestras que tiene un extremo superior abierto, un extremo inferior, y una pared lateral que se extiende entre estos definiendo un interior en este. De manera opcional, el tubo puede tener un cierre que se puede perforar en ambos extremos del tubo para permitir el muestreo de las muestras desde ambos extremos del tubo. El aparato también incluye un cierre que puede emplearse en el contenedor de recogida de muestras para sellar el extremo superior abierto. El aparato incluye además un separador mecánico dispuesto dentro del interior y adaptado para separar una muestra de fluido en una primera y en una segunda fase dentro del contenedor de recogida de muestras. El separador mecánico incluye al menos una característica seleccionada de entre un grupo consistente en al menos dos regiones de diferentes densidades y un gradiente de densidad. El aparato incluye además un elemento de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto dentro del interior del contenedor de recogida de muestras. En una configuración, el elemento de detección se posiciona dentro del espacio que contiene la segunda fase de la muestra de fluido separada.

- 55 El separador mecánico se puede deformar de manera radial entre una primera posición en la que la muestra de fluido puede pasar entre una superficie interior de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras y el separador mecánico, y una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico entra en

contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral del contenedor y el separador mecánico.

5 El separador mecánico puede incluir un fuelle que se puede deformar que tiene un extremo superior y un extremo inferior, y una parte de sellado dispuesta entre ellos que proporciona el compromiso de sellado con la pared lateral del contenedor de recogida de muestras. El separador mecánico puede incluir también un flotador, que tiene una primera densidad, conectado con una parte de los fuelles, y un lastre conectado con una parte de los fuelles y que tiene una segunda densidad, siendo la segunda densidad mayor que la primera densidad.

10 De manera opcional, el separador mecánico puede incluir un cuerpo separador que tiene un agujero de paso definido en este, agujero de paso adaptado para permitir el paso del fluido a través de él. El cuerpo separador puede incluir un flotador, que tiene una primera densidad, y un lastre, que tiene una segunda densidad mayor que la primera densidad, en donde una parte del flotador se conecta a una parte del lastre. El separador mecánico puede estar conectado de manera que se pueda liberar con una parte del cierre y/o una parte de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras. En otra configuración, el separador mecánico se puede conectar con una parte del cierre en una primera posición inicial, y el separador mecánico se puede conectar con una parte de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras en una segunda posición de sellado.

En ciertas configuraciones, la muestra de fluido es sangre. El elemento de detección puede incluir un sensor para detectar al menos uno de entre la energía metabólica, el dióxido de carbono, el pH, y los compuestos orgánicos volátiles. El elemento de detección puede ser un sensor óptico. En una configuración, la segunda fase es más densa que la primera fase y el elemento de detección se proporciona en comunicación con la segunda fase.

20 En otras configuraciones, se puede disponer un reactivo de lisis dentro del interior del contenedor de recogida de muestras. De manera opcional, el volumen de fluido de la segunda fase es desde aproximadamente 1 µl hasta aproximadamente 500 µl. En otra configuración el volumen de fluido de la segunda fase es desde aproximadamente 5 µl hasta aproximadamente 200 µl.

25 De acuerdo con otra realización de la presente invención, un aparato para detectar la presencia de un microorganismo incluye un contenedor de recogida de muestras que incluye un extremo superior abierto, un extremo inferior, y una pared lateral que se extiende entre estos que tiene una superficie interior y que define un interior en este, con el interior adaptado para contener una muestra de fluido en este. El aparato incluye además un cierre que se puede conectar con el contenedor de recogida de muestras para sellar el extremo superior abierto. El aparato incluye también un separador mecánico dispuesto dentro del interior, en donde al menos una parte del separador mecánico se puede deformar de manera radial entre una primera posición en la que el fluido puede pasar entre la superficie interior del contenedor de recogida de muestras y el separador mecánico, hasta una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico entra en contacto con la superficie interior de la pared lateral para evitar que el fluido pase entre la superficie interior del contenedor de recogida de muestras y el separador mecánico. El separador mecánico se adapta para aislar una región concentrada de microorganismos del resto de la muestra de fluido en respuesta a una fuerza rotacional aplicada.

En ciertas configuraciones, el volumen de la región concentrada de microorganismos es desde aproximadamente 1 µl hasta aproximadamente 500 µl. Aún en otras configuraciones, el volumen de la región concentrada de microorganismos es desde aproximadamente 5 µl hasta aproximadamente 200 µl

40 El aparato puede incluir también un elemento de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto dentro de la región concentrada de microorganismos. El elemento de detección puede incluir un sensor para detectar al menos uno de entre la energía metabólica, el dióxido de carbono, el pH, y los compuestos orgánicos volátiles.

45 El separador mecánico puede incluir un fuelle que se puede deformar que tiene una parte que se puede deformar de manera radial, un flotador conectado con una parte del fuelle y que tiene una primera densidad, y un lastre conectado con una parte del fuelle que tiene una segunda densidad, siendo la segunda densidad mayor que la primera densidad. De manera opcional, el separador mecánico puede incluir un cuerpo separador que tiene un agujero de paso definido en este, agujero de paso adaptado para permitir el paso del fluido a través del mismo. El cuerpo separador puede incluir un flotador, que tiene una primera densidad, y un lastre, que tiene una segunda densidad mayor que la primera densidad, en donde una parte del flotador se conecta a una parte del lastre. El separador mecánico se puede conectar de manera que se pueda liberar con una parte del cierre y/o una parte de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras. El separador mecánico se puede conectar con una parte del cierre en una primera posición inicial, y el separador mecánico se puede conectar con una parte de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras en una segunda posición de sellado. Opcionalmente, se puede disponer un reactivo de lisis dentro del interior del contenedor de recogida de muestras.

55 Aún de acuerdo con otra realización de la presente invención, un aparato para detectar la presencia de un microorganismo incluye un contenedor de recogida de muestras que tiene un extremo superior abierto, un extremo inferior, y una pared lateral que se extiende entre estos que define un interior en este. Se puede conectar un cierre con el contenedor de recogida de muestras para sellar el extremo superior abierto. Se dispone un separador

mecánico dentro del interior y se adapta para separar una muestra de fluido en una primera y una segunda fase dentro del contenedor de recogida de muestras. El separador mecánico incluye una válvula de una vía para aislar una primera parte de la cámara del interior de una segunda parte de la cámara del interior. La válvula de una vía puede realizar la transición desde una posición cerrada, en la que la primera parte de la cámara está en aislamiento de fluidos con la segunda parte de la cámara, a una posición abierta, en la que una parte de la muestra de fluido puede pasar a través de la válvula de una vía desde la primera parte de la cámara a la segunda parte de la cámara. El aparato incluye además un elemento de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto dentro del interior del contenedor de recogida de muestras.

La válvula de una vía puede realizar la transición desde la posición cerrada a la posición abierta tras la aplicación de una fuerza rotacional aplicada. La válvula de una vía posteriormente puede realizar la transición desde la posición abierta a la posición cerrada tras el cese de la fuerza rotacional aplicada.

En una construcción, el volumen de fluido de la segunda cámara es desde aproximadamente 1 μl hasta aproximadamente 500 μl . De manera alternativa, el volumen de fluido de la segunda cámara es desde aproximadamente 5 μl hasta aproximadamente 200 μl . El elemento de detección puede incluir un sensor para detectar al menos uno de entre la energía metabólica, el dióxido de carbono, el pH, y los compuestos orgánicos volátiles. De manera opcional, el aparato puede incluir un reactivo de lisis dispuesto dentro del interior del contenedor de recogida de muestras.

Aún de acuerdo con otra realización de la presente invención, un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra de fluido incluye proporcionar una muestra de fluido dentro de un contenedor de recogida de muestras que tiene una pared lateral que define un interior en este. El interior incluye un separador mecánico adaptado para separar la muestra de fluido en una primera y una segunda fase dentro del contenedor de recogida de muestras y un elemento de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto en este. El método también incluye someter el contenedor de recogida de muestras a una fuerza rotacional aplicada para aislar la región concentrada de microorganismos, y detectar mediante un elemento de detección la presencia o ausencia de microorganismos dentro de la región concentrada de microorganismos.

El paso de someter el contenedor de recogida de muestras a una fuerza rotacional aplicada puede llevarse a cabo en una centrifugadora. El paso de detección de la presencia o ausencia de un microorganismo puede ocurrir en menos de 24 horas. De manera alternativa, el paso de detección de la presencia o ausencia de microorganismos puede ocurrir en menos de 8 horas.

En ciertas configuraciones, el elemento de detección incluye un sensor para detectar uno de entre la energía metabólica, el dióxido de carbono, el pH, y los compuestos orgánicos volátiles. En ciertas construcciones, el volumen de fluido de la región concentrada de microorganismos es desde aproximadamente 1 μl hasta aproximadamente 500 μl . De manera alternativa, el volumen de fluido de la región concentrada de microorganismos es desde aproximadamente 5 μl hasta aproximadamente 200 μl .

Aún de acuerdo con otra realización de la presente invención, un método para aislar un microorganismo en una muestra de fluido incluye proporcionar una muestra de fluido dentro de un contenedor de recogida de muestras que tiene una pared lateral que define un interior en este. El interior incluye un separador mecánico adaptado para separar la muestra de fluido en una primera y una segunda fase dentro del contenedor de recogida de muestras y un elemento de detección capaz de detectar la presencia de microorganismos dispuestos en este. El método también incluye someter el contenedor de recogida de muestras a una fuerza rotacional aplicada tal que el separador mecánico se deforme hasta una primera posición en la que la muestra de fluido pueda pasar entre la superficie interior de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras y el separador mecánico, y entonces, tras el cese de la fuerza rotacional aplicada vuelva a una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico entra en contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral del contenedor y el separador mecánico. Esto crea una barrera entre la primera y la segunda fases separadas de la muestra de fluido. Los microorganismos están presentes en una de entre la primera y la segunda fase y aislados de la otra primera o segunda fase.

El método puede incluir también la detección mediante el elemento de detección de la presencia o ausencia de microorganismos dentro de una de entre la primera o la segunda fase.

Aún de acuerdo con una realización adicional de la presente invención, un método de concentración de microorganismos a partir de una muestra de fluido incluye proporcionar una muestra de fluido dentro de un contenedor de recogida de muestras que tiene una pared lateral que define un interior en este. El método también incluye proporcionar un separador mecánico dentro del interior, separador mecánico adaptado para deformarse de manera radial entre una primera posición en la que el fluido puede pasar entre la superficie interior de la pared lateral del contenedor de recogida de muestras y el separador mecánico, y una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico entra en contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral del contenedor y el separador mecánico. El método aún además incluye someter al contenedor de recogida de muestras a una centrifugación a través de la cual el separador mecánico se deforma y se traslada axialmente dentro del interior, y a

5 través de la cual una parte de mayor densidad de la muestra de fluido se traslada hacia el interior del contenedor de recogida de muestras. El método también incluye el cese de la centrifugación a través de lo cual el separador mecánico forma una barrera entre la parte de mayor densidad de la muestra de fluido y la parte de menor densidad de la muestra de fluido. El método también incluye proporcionar un elemento de detección para detectar la presencia o ausencia de un microorganismo dentro del interior del contenedor de recogida de muestras adyacente a la parte de mayor densidad de la muestra de fluido.

10 El separador mecánico puede tener al menos una característica seleccionada de un grupo consistente en al menos dos regiones de diferentes densidades y un gradiente de densidad. La al menos una característica se puede seleccionar basada en la densidad de la muestra de líquido completa de manera tal que la proporción entre el volumen de la parte de mayor densidad separada con la parte de menor densidad no es mayor que 1:5. De manera alternativa, la al menos una característica se selecciona en base a la densidad de la muestra de líquido completa de manera tal que la proporción de volumen de la parte de mayor densidad separada con la parte de menor densidad no es mayor que 1:10. El elemento de detección puede incluir un sensor para detectar al menos la energía metabólica, el dióxido de carbono, el pH, y los compuestos orgánicos volátiles.

15 Detalles y ventajas adicionales de la invención resultarán claros a partir de la siguiente descripción detallada al leerse en conjunción con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

20 La FIG. 1 es una vista frontal de la sección transversal de un contenedor de recogida de muestras que tiene un separador mecánico dispuesto en este en una condición inicial de pre separación de acuerdo con una realización de la presente invención

La FIG. 1A es una vista frontal de la sección transversal del contenedor de recogida de muestras que tiene un separador mecánico dispuesto como el de la FIG. 1 en una condición separada de fase de acuerdo con una realización de la presente invención.

25 La FIG. 2 es una vista en perspectiva de un ensamblaje de separador mecánico que tiene un flotador que define un agujero de paso y un lastre de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 3 es una vista en perspectiva alternativa del ensamblaje de separador mecánico de la FIG. 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 4 es una vista superior del separador mecánico de la FIG. 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 La FIG. 5 es una vista lateral del separador mecánico de la FIG. 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 6 es una vista de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 2 tomada a lo largo de la línea 6-6 de la FIG. 5 de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 La FIG. 7 es una vista frontal del separador mecánico de la FIG. 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 8 es una vista de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 2 tomada a lo largo de la línea 8-8 de la FIG. 7 de acuerdo con una realización de la presente invención.

40 La FIG. 9 es una sección transversal de un contenedor de recogida de muestras que tiene un separador mecánico dispuesto en este y conectado de manera que se pueda liberar con una parte del cierre de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 10 es una vista frontal de la sección transversal parcial del contenedor de recogida de muestras de la FIG. 9 que tiene el separador mecánico proporcionado en este en una condición de pre separación inicial de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 La FIG. 11 es una vista frontal de la sección transversal parcial del contenedor de recogida de muestras de la FIG. 9 que tiene el separador mecánico proporcionado en este en una condición separada de fase de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 12 es una vista frontal en perspectiva de un separador mecánico que tiene un flotador, un lastre, y un fuelle que se puede deformar de acuerdo con una realización de la presente invención.

50 La FIG. 13 es una vista frontal del separador mecánico de la FIG. 12 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 14 es una vista de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 13 tomada a lo largo de la línea 14-14 de la FIG. 13 de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 La FIG. 15 es una vista frontal de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 12 dispuesto dentro de un contenedor de recogida de muestras durante la transferencia de las muestras de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 16 es una vista frontal de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 12 dispuesto dentro de un contenedor de recogida de muestras después de la separación de fase de acuerdo con una realización de la presente invención.

10 La FIG. 17 es una vista frontal de un separador mecánico esférico en una condición de pre separación inicial de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 18 es una vista frontal del separador mecánico esférico de la FIG. 17 durante la centrifugación de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 19 es una vista superior de la sección transversal de un separador mecánico que tiene una válvula de una vía en una condición sellada de acuerdo con una realización de la presente invención.

15 La FIG. 20 es una vista superior de la sección transversal del separador mecánico de la FIG. 19 durante la centrifugación de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 21 es una representación gráfica de señales de microorganismos a lo largo del tiempo para el Staph aureus de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 La FIG. 22 es una representación gráfica de señales de microorganismos a lo largo del tiempo para el Candida glabrata de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 23 es una vista de la sección transversal en una perspectiva parcial de un contenedor de recogida de muestras de acuerdo con una realización de la presente invención.

Descripción de las realizaciones preferidas

25 Con el propósito de la descripción de aquí en adelante, las palabras “superior”, “inferior”, “derecha”, “izquierda”, “vertical”, “horizontal”, “arriba”, “abajo”, “lateral”, “longitudinal”, y términos espaciales similares, si se usan, se relacionarán con las realizaciones descritas tal como se orienta en las figuras de dibujos. Sin embargo, se ha de comprender que se pueden asumir muchas variaciones y realizaciones alternativas excepto que expresamente se indique lo contrario. Se ha de comprender también que los dispositivos y realizaciones específicas ilustradas en los dibujos adjuntos y descritas en la presente memoria son implemente realizaciones ejemplares de la invención.

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se puede usar un separador mecánico dentro de un contenedor de recogida de muestras con el propósito de proporcionar la separación de una muestra de fluido dentro del contenedor de recogida de muestras en componentes de fase de mayor y menor densidad, como se discutirá en la presente memoria. Por ejemplo, el presente separador mecánico se puede usar para proporcionar una separación de fases de mayor y menor densidad a través del uso de una flotabilidad diferencial que provoca que un área de sellado del separador mecánico se contraiga al sumergirse en una muestra y sea expuesta a fuerzas gravitacionales elevadas a través de una fuerza rotacional o centrifugación aplicada. En una realización, se pueden proporcionar elevadas fuerzas gravitacionales en una tasa de al menos 2,000 revoluciones/minuto, tal que al menos 3,400 revoluciones/minuto, en una centrifugadora estándar. En otra realización, se pueden proporcionar elevadas fuerzas gravitacionales en una tasa de al menos una fuerza de 2,000 g, tal como al menos una fuerza de 4,000g. El separador mecánico de la presente invención se puede usar para aislar una fase más pesada de una muestra de fluido, que incluye cualquier microorganismo presente dentro de una muestra de sangre, a partir de una fase más ligera de muestra de fluido. La separación de la fase más pesada de la fase más ligera proporciona una mayor concentración de microorganismos por unidad de fluido en la muestra separada que comparado al volumen total de fluido extraído de un paciente. Proporcionando una región concentrada de microorganismos en la que los microorganismos de una muestra de fluido se separan de un volumen de componentes de sangre de fase más ligera, el tiempo requerido para la inoculación y el crecimiento del cultivo de la muestra se puede reducir de manera significativa, tal como se discutirá en la presente memoria.

50 El tiempo requerido para realizar ciertas pruebas diagnósticas, tales como la detección de la sepsis, se puede mejorar de manera significativa mediante la separación de toda la sangre del paciente en sus componentes, tales como los componentes de la fase de menor densidad, y cualquier microorganismo presente en la muestra de fluido (los componentes de la fase de mayor densidad). Todas las muestras de sangre normalmente son recogidas mediante punción venosa a través de una cánula o aguja unida a una jeringuilla o un tubo de recogida de sangre. Después de la recogida, se puede realizar la separación de la sangre en fases de inferior y superior densidad mediante la rotación de la jeringuilla o el tubo en una centrifugadora. Para mantener la separación, se debe

posicionar una barrera entre los componentes de la fase de mayor densidad y de menor densidad. Esto permite que los componentes separados sean examinados posteriormente y manejados en consecuencia.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, como se muestra en las FIG 1-1A, un aparato 80 para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra de fluido incluye un contenedor 82 de recogida de muestras que tiene un extremo superior 90 abierto, un extremo inferior 88 cerrado, y una pared lateral 92 que se extiende entre estos definiendo un interior 94 en el mismo.

Específicamente, el contenedor 82 de recogida puede ser un tubo de recogida de muestras, tal como un tubo de muestras químicas proteómicas, de diagnósticos moleculares, un tubo de recogida de sangre, u otros fluidos corporales, un tubo de muestras de coagulación, un tubo de muestras hematológicas, y similares. De manera deseable, el contenedor 82 de recogida es un tubo de recogida de sangre evacuada. El contenedor 82 de recogida se puede adaptar para recibir una muestra de fluido, tal como sangre, orina, esputo, saliva, fluido cerebroespinal, fluido pleural, y/u otros fluidos corporales. En otros casos, la muestra de fluido se puede obtener a partir de muestras industriales, de comida, y cosméticos para cultivos de microbiología.

En una realización, el contenedor 82 de recogida puede contener aditivos adicionales según sean requeridos para los procedimientos de prueba particulares, tales como los agentes potenciadores del crecimiento microbiano, los reactivos de lisis, y similares. Los reactivos de lisis se pueden usar para descomponer los glóbulos rojos para una separación más fácil de los microorganismos, como es conocido en la técnica. Dichos aditivos pueden ser en forma de partícula o líquido y se pueden rociar en la pared 92 lateral cilíndrica del contenedor 82 de recogida o se pueden ubicar en la parte inferior del contenedor 82 de recogida. El interior 94 incluye un diámetro interior que se extiende de manera sustancialmente uniforme desde el extremo 90 abierto superior hasta una ubicación sustancialmente adyacente al extremo 88 cerrado inferior a lo largo del eje longitudinal L del contenedor 82 de recogida, como se muestra en la FIG.1.

El contenedor 82 de recogida puede estar hecho de uno o más de los siguientes materiales representativos: polipropileno, polietileno, tereftalato (PET), vidrio, o combinaciones de los mismos. El contenedor 82 de recogida puede incluir configuraciones de pared única o de múltiples paredes. De manera adicional, el contenedor 82 de recogida se puede construir de cualquier tamaño que sea práctico para obtener una muestra biológica apropiada. Por ejemplo, el contenedor 82 de recogida puede ser de un tamaño similar a los tubos convencionales de gran volumen, los tubos de pequeño volumen, o los tubos de micro volumen, como es conocido en la técnica. En una realización particular, el contenedor 82 de recogida puede ser un tubo de recogida de sangre evacuada estándar de 13 ml, como es conocido en la técnica.

El extremo 90 abierto superior se estructura para al menos de manera parcial recibir un cierre 84 en el mismo para formar un sello impermeable al líquido. El cierre 84 incluye un extremo 96 superior y un extremo 98 inferior estructurados para ser al menos de manera parcial recibidos dentro del contenedor 82 de recogida. Las partes del cierre 84 adyacentes al extremo 90 superior definen un diámetro exterior máximo que excede el diámetro interior del contenedor 82 de recogida. En una realización, el cierre 84 incluye un tabique 100 perforable que se puede sellar que se puede penetrar mediante una cánula de aguja (no mostrada). Las partes del cierre 84 que se extienden hacia abajo desde el extremo inferior 98 se pueden estrechar desde un diámetro menor que es aproximadamente igual a, o ligeramente menor que, el diámetro interior del contenedor 82 de recogida hasta un diámetro mayor que es mayor que el diámetro interior del contenedor 82 de recogida en el extremo superior 96. Así, el extremo 98 inferior del cierre 84 puede ser impulsado a una parte del contenedor 82 de recogida adyacente al extremo 90 superior abierto. La resistencia inherente del cierre 84 puede asegurar un compromiso de sellado con el interior 94 de la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida. En una realización, el cierre 84 se puede formar de un material elastomérico unitario, que tiene cualquier tamaño y dimensiones adecuadas para proporcionar el compromiso de sellado con el contenedor 82 de recogida. De manera opcional, el cierre 84 puede ser al menos de manera parcial rodeado por una protección, tal como una protección Hemogard®, disponible comercialmente de Becton, Dickinson y Compañía.

Referente a las FIG 1-8, se puede disponer un separador mecánico 40 de la presente invención dentro del interior 94 y se adapta para separar la muestra de fluido dentro del contenedor 82 de recogida en una primera y una segunda fase dentro del contenedor 82 de recogida.

Referente a las FIG. 2-8, el separador mecánico 40 de la presente invención incluye un cuerpo separador 41 que incluye un flotador 42 y un lastre 44 conectado al flotador 42. En una realización, el flotador 42 tiene una primera densidad y el lastre 44 tiene una segunda densidad, con la segunda densidad siendo mayor que la primera densidad. En otra realización, el flotador 42 tiene una primera flotabilidad y el lastre 44 tiene una segunda flotabilidad con la primera flotabilidad siendo mayor que la segunda flotabilidad. En una realización, es deseable que el flotador 42 del separador mecánico 40 esté hecho de un material que tenga una densidad que sea más ligera que la del líquido o muestra destinada a ser separado en dos fases. Por ejemplo, si se desea separar la sangre humana en suero y plasma, entonces es deseable que el flotador 42 tenga una densidad de no más de aproximadamente 1.020 g/cc. Se ha de notar en la presente memoria que aunque el término "suero" se refiere normalmente a la parte de fluido del plasma de sangre después de que los factores de coagulación (tales como el fibrinógeno y la protrombina) se hayan eliminado, que "suero" como se usa en la presente memoria puede incluir también la lisis de fragmentos de glóbulos rojos y estructuras celulares asociadas. En una configuración, el flotador 42 del separador mecánico 40

puede ser extruido y/o moldeado de un material que se puede deformar de manera elástica y que se puede sellar, tal como un elastómero termoplástico (TPE). En aún otra realización, el flotador 42 puede ser extruido y/o moldeado de un material que se puede deformar de manera elástica que presenta buenas características de sellado cuando establece contacto con un contenedor de recogida, como se discutirá en la presente memoria. El mantenimiento de la densidad del flotador dentro de las tolerancias especificadas se consigue de manera más fácil mediante el uso de un material estándar que no requiera el compuesto con, por ejemplo, micro esferas de vidrio huecas para reducir la densidad del material.

El separador mecánico 40 también incluye un agujero 46 de paso definido en este, tal que a lo largo de un eje T del cuerpo 41 del separador. Como se muestra en las FIG 3, 5 y 8, el agujero de paso 46 se puede extender a lo largo de todo el cuerpo 41 del separador e incluir una primera abertura 48 y una segunda abertura 50 alineadas a lo largo del eje T. En una configuración, el agujero 46 de paso biseca o sustancialmente biseca el centro volumétrico del cuerpo 41 del separador. En una realización, el agujero 46 de paso se dispone completamente dentro del flotador 42. En una realización adicional, el flotador 42 puede incluir además una primera pestaña 52 extendida adyacente a la primera abertura 48 del agujero 46 de paso, y una segunda pestaña 54 extendida adyacente a la segunda abertura 50 del agujero 46 de paso. La primera pestaña 52 extendida y/o la segunda pestaña 54 extendida se pueden formar con el flotador 42, formando una parte del flotador 42 en sí. En otra configuración, la primera pestaña 52 extendida y/o la segunda pestaña 54 extendida se pueden formar de manera separada y unirse posteriormente con el flotador 42. La primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida se pueden proporcionar por encima, tal que sustancialmente por encima, del eje T del cuerpo 41 del separador. La primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida se pueden extender también alrededor, tal que sustancialmente alrededor, de una parte del agujero 46 de paso, tal como en una forma sustancialmente arqueada que se extiende hacia fuera alrededor de una parte 56 superior del agujero 46 de paso. La primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida se pueden extender sustancialmente hacia fuera desde el flotador 42 en una dirección paralela o sustancialmente paralela al eje T del cuerpo 41 del separador, de manera tal que la primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida puedan tener la misma forma y curvatura o sustancialmente la misma forma y curvatura. En aún otra realización, como se muestra en la FIG. 8, la primera pestaña 52 extendida incluye un primer borde 68 más externo en la parte más externa superior del primer lado del agujero 46 de paso, y la segunda pestaña 54 extendida incluye un segundo borde 70 más externo en la parte correspondiente más externa superior de un segundo lado del agujero 46 de paso. En una configuración, el primer borde 68 más externo se extiende hacia fuera una distancia que es mayor que una parte 72 más externa inferior del primer lado del agujero 46 de paso. El segundo borde 70 más externo también se extiende hacia fuera una distancia que es mayor que la correspondiente parte 74 más externa inferior del segundo lado del agujero 46 de paso. Por consiguiente, el diámetro D_1 del cuerpo 41 separador tomado sobre la primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida sobre una parte superior del agujero 46 de paso es ligeramente mayor que el diámetro D_2 del cuerpo 41 separador tomado sobre la parte inferior del agujero 46 de paso definido por las partes 72, 74 más externas inferiores.

En una realización, el flotador 42 tiene una superficie 58 exterior que es de manera general de forma arqueada, tal que al menos parcialmente redondeada o sustancialmente redondeada, y una superficie 60 de unión, mostrada en las FIG. 6 y 8, adaptada para conectar con una parte del fuelle 44. El fuelle 44 también incluye una superficie 62 exterior que es también de manera general de forma arqueada, tal como al menos parcialmente redondeada o sustancialmente redondeada, y una superficie 64 de contacto, también mostrada en las FIG. 6 y 8, que se adapta para unirse con la superficie 60 de unión del flotador 42. En una realización, cuando se toman juntas, la superficie exterior 58 del flotador 42 y la superficie exterior 62 del lastre 44 forman una superficie exterior generalmente redonda, tal como una forma esferoide. Se ha de comprender en la presente memoria que el término "forma esferoide" puede incluir otras configuraciones, además de una esfera perfecta, estos son aspectos de la invención que pueden proporcionar diámetros ligeramente no uniformes tomados a través del punto medio. Por ejemplo, diferentes planos tomados a través del flotador 42 y el lastre 44 que bisecan el punto medio del separador mecánico 40 pueden tener diámetros que varían y aun así dar lugar a un separador mecánico 40 de forma generalmente redondeada o de bola que tiene una forma esferoide. En una realización, el flotador 42 y el lastre 44 se pueden formar de manera separada y ensamblar posteriormente. En otra realización, el flotador 42 y el lastre 44 pueden estar co-formados, así como co-extruidos y/o co-moldeados, tal como por un proceso de moldeado de dos etapas o multi etapa de manera tal que ambos componentes se enlazan de manera integral entre sí para formar un cuerpo separador 41 completo. En otra configuración, enlace integral entre el flotador 42 y el lastre 44 puede ser creado mediante un enlace material entre los dos componentes, mediante un entrelazamiento mecánico, o mediante la combinación de un enlace material y un entrelazamiento mecánico. Además, el flotador 42 y el lastre 44 se pueden enlazar entre sí mediante una operación separada de moldeado posterior, tal como mediante adhesivo, mediante unión por calor, y/o mediante soldadura por ultrasonidos. Como se muestra en las FIG. 6 y 8, el lastre 44 puede incluir un saliente adjunto 66 que ayuda en la conexión del lastre 44 y del flotador 42.

En una realización, es deseable que el lastre 44 del separador mecánico 40 esté hecho de un material que tenga una mayor densidad que el líquido destinado a ser separado en dos fases. En una realización, el lastre 44 puede estar formado de polipropileno relleno de mineral. Se anticipa en la presente memoria que tanto el flotador 42 como el lastre 44 podrían estar formados de otros diversos materiales con la suficiente compatibilidad biológica, estabilidad de densidad, compatibilidad aditiva, neutralidad para analizar las interacciones, adsorción y capacidad de lixiviación.

Debido a las densidades diferenciales del flotador 42 y del lastre 44, el separador mecánico 40 incluye un centro R de masa que es una compensación del centro del volumen R1 del cuerpo separador 41, como se muestra en la FIG. 7. Específicamente, el volumen del cuerpo separador 41 representado por el flotador 42 puede ser significativamente mayor que el volumen del cuerpo separador 41 representado por el lastre 44. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el centro R de masa del cuerpo separador 41 puede ser compensado desde el agujero 46 de paso. En la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2010/0288 694 se muestran características adicionales de estructuras mecánicas similares adecuadas para su uso en la presente invención.

Como se muestra en las FIG. 1-1A, el aparato 80 puede incluir también un elemento 91 de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo. En una configuración, el elemento 91 de detección se puede ubicar dentro del interior 94 y próximo al extremo 88 inferior cerrado del contenedor 82 de recogida de muestras. El elemento 91 de detección puede incluir mecanismos ópticos, electrónicos, térmicos, electroquímicos, de impedancia, de capacitancia, indicadores de redox, contadores de partículas y/o de turbidez. En una configuración, el elemento 91 de detección se puede adaptar para detectar la presencia de microorganismos, de energía metabólica y/o de productos metabólicos, tales como el dióxido de carbono, el pH, o los componentes orgánicos volátiles producidos durante el crecimiento microbiano. El elemento 91 de detección se puede proporcionar dentro del contenedor 82 de recogida de muestras de manera tal que el elemento 91 de detección se proporcione en comunicación con la fase segunda o más pesada una vez que se completa la separación. En otras realizaciones, como se muestra en la FIG. 1A, el elemento 91 de detección se puede proporcionar en comunicación por cable o inalámbrica con un módulo 93 de detección para mostrar la información recopilada por el elemento 91 de detección.

Referente a las FIG. 1, 9 y 10, en la práctica, el separador mecánico 40 de la presente invención se puede orientar dentro del contenedor 82 de recogida en una posición inicial en la que el agujero 46 de paso del separador mecánico 40 se alinea con el extremo superior 90 abierto del contenedor 82 de recogida. En la posición inicial, el agujero 46 de paso se adapta para permitir al fluido pasar a través de este, de manera tal como desde una cánula de una aguja (no mostrada) que ha perforado el tabique perforable 100 del cierre 84 y se proporciona en comunicación de fluido con el interior 94 del contenedor 82 de recogida. En otra realización, como se muestra en la FIG. 9, el separador mecánico 40 se puede conectar también de manera que se pueda liberar con una parte del cierre 84 y/o la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida de muestras. En la posición inicial, una muestra de fluido, tal como una muestra de sangre que potencialmente incluye un organismo microbiano o una pluralidad de organismos microbianos, se introduce en el contenedor 82 de recogida de muestras. La muestra puede pasar a través del agujero 46 de paso del separador mecánico 40 y ser recibida dentro de la parte inferior del interior 94.

El separador mecánico 40 se puede adaptar a la transición desde la posición inicial, como se muestra en las FIG. 1, 9 y 10, hasta la posición de sellado, como se muestra en las FIG. 1A y 11. En la posición inicial, el agujero 46 de paso se orienta en una posición abierta para permitir al fluido pasar a través de este en la dirección indicada en la FIG. 10 mediante la flecha F de flujo. Referente a la FIG. 9, la posición abierta inicial del agujero 46 de paso se alinea de manera sustancial con el eje longitudinal L del contenedor 82 de recogida. Referente a la FIG. 11, tras la aplicación de la fuerza rotacional, tal como durante la fuerza centrífuga, el separador mecánico 40 se deforma de manera suficiente para desacoplarse de la posición inicial y/o conectar con el cierre 84 y rotar en la dirección mostrada por la flecha direccional D de la FIG. 11 hasta la posición de sellado en la que el agujero 46 de paso está en una posición sustancialmente cerrada. En la posición sustancialmente cerrada, el flotador 42, que incluye la primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida, forma un compromiso de sellado con el interior 94 del contenedor 82 de recogida evitando sustancialmente que el fluido sea recibido a través del agujero 46 de paso o alrededor del cuerpo separador 41.

En una configuración, el agujero 46 de paso se alinea sustancialmente con el extremo superior 90 abierto del contenedor 82 de recogida a lo largo de al menos una parte del eje longitudinal L en la posición abierta, y el agujero 46 de paso se alinea sustancialmente de manera perpendicular al eje longitudinal en la posición cerrada. Se ha de notar que la transición del agujero 46 de paso desde la posición abierta a la posición cerrada coincide con la rotación del separador mecánico 40 desde una primera posición inicial a una segunda posición cerrada. En otra configuración, el separador mecánico 40 se conecta con una parte del cierre 84 y/o la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida de muestras en la primera posición inicial, y el separador mecánico 40 se conecta con una parte de la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida en la segunda posición de sellado.

Tras la aplicación de la fuerza rotacional y la transición del separador mecánico 40 como se muestra en la Fig. 11, el separador mecánico 40 experimenta un momento rotacional mientras todavía está unido al cierre 84 y, después de liberarse del cierre 84, rota aproximadamente 90° para estar orientado con el lastre 44 mirando el extremo inferior 88 del contenedor 82 de recogida.

Una vez que el separador mecánico 40 entra en contacto con el fluido contenido dentro del contenedor 82 de recogida, el aire que ocupa el agujero 46 de paso es desplazado de manera progresiva por el fluido según se sumerge el dispositivo. Cuando el separador mecánico 40 se sumerge en el fluido, el flotador 42 tiene una mayor flotabilidad que el lastre 44, lo que genera una fuerza diferencial a lo largo del separador mecánico 40. Durante la centrifugación, la fuerza diferencial provoca que el componente del flotador 42 se alargue y se contraiga desde la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida, reduciendo de este modo el diámetro efectivo y abriendo un camino de comunicación para el flujo de fluido, tal como para los componentes de la fase de mayor y menor densidad, más

allá del cuerpo separador 41. Como el separador mecánico 40 se deforma de manera radial, este se traslada de manera axial dentro del interior 94, y una parte 53 de densidad más ligera se traslada hacia arriba en el interior 94 mientras que una parte 55 de una densidad más pesada de la muestra de fluido se traslada hacia abajo del interior 94 del contenedor 82 de recogida de muestras, como se muestra en la FIG. 1A.

5 Se ha de notar que el flotador 42 se puede adaptar para su deformación en una dirección sustancialmente perpendicular al agujero 46 de paso. En la posición inicial, como se muestra en la FIG. 1, el separador mecánico 40 forma un sello 313 con la pared lateral 82. Según se elimina la fuerza rotacional aplicada, el flotador 42 se recupera y el área de sellado definida por el flotador 42 y la primera pestaña 52 extendida y la segunda pestaña 54 extendida se vuelve a expandir para sellarse contra el interior 94 del contenedor 82 de recogida a lo largo de un segundo
10 perímetro 106 de sellado, como se muestra en la FIG. 1A. Por consiguiente, el separador mecánico 40 se adapta para evitar que el fluido pase entre o alrededor del cuerpo separador 41 y el contenedor 82 de recogida, y también evita que el fluido pase a través del agujero 46 de paso, estableciendo de manera efectiva una barrera. El segundo perímetro de sellado 106 establece una barrera entre las fases de mayor y menor densidad dentro de la muestra.

15 En ciertas configuraciones, el cuerpo 41 del separador puede incluir un centro R de masa que es compensado a partir del eje T, mostrado en la FIG. 2, del cuerpo separador 41. En esta configuración, el separador mecánico 40 puede hacer la transición desde una primera posición (tal como se muestra en las FIG. 1, 9, y 10) en las que el separador mecánico 40 se conecta con una parte del cierre 84 (mostrada en la FIG. 9) o una parte de la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida (mostrado en las FIG. 1 y 10) y el centro R de masa se orienta sobre un primer lado del eje longitudinal L del contenedor 82 de recogida, hasta una segunda posición, tal como se muestra
20 en las FIG. 1A y 11, en la que el separador 40 se desconecta del cierre o de la posición de conexión inicial con el contenedor 82 de recogida, y el centro R de masa se orienta sobre el eje longitudinal L del contenedor 82 de recogida. En algún punto, durante la transición del centro R de masa al eje longitudinal L del contenedor 82 de recogida, el flotador 42 del separador mecánico 40 se debe deformar en una dirección sustancialmente perpendicular al eje T del cuerpo 41 del separador para permitir la transición del separador mecánico 40 desde la
25 primera posición inicial hasta la segunda posición de sellado. Durante el alargamiento del flotador 42, las fases de mayor y menor densidad de la muestra pueden pasar entre el separador mecánico 40, específicamente el flotador 42 alargado, y la pared lateral 92 del contenedor 82 de recogida en el que el separador mecánico 40 está en una posición intermedia. Desde la posición intermedia, el separador mecánico 40 puede realizar posteriormente la transición hasta la posición de sellado, en la que una parte del flotador 42 forma un compromiso de sello con una
30 parte del interior del contenedor de recogida, tras la terminación de la fuerza rotacional aplicada.

Por consiguiente, el separador mecánico de la presente invención se puede considerar que realiza la transición entre las tres fases de operación: la fase inicial en la que se proporciona la muestra a través del agujero de paso del cuerpo separador; la fase intermedia en la que se desconecta el separador de la posición inicial y el flotador 42 y/o el miembro de sellado que se puede deformar se alargan para permitir el paso de las fases de mayor y menor
35 densidad a través de este; y la fase de sellado en la que el flotador 42 y/o el miembro de sellado que se puede deformar forman una barrera con una parte del contenedor de recogida. Durante esta secuencia de fases, el separador mecánico se puede considerar como "abierto-abierto-cerrado" en donde una fase "abierta" se define como un estado en el cual el separador mecánico no forma una barrera de sellado con el contenedor de recogida evitando el paso del fluido a través de éste y a su alrededor. En contraste, una fase "cerrada" se define como un estado en el
40 que el separador mecánico 40 no forma una barrera de sellado con el contenedor de recogida evitando el paso del fluido a través de éste y a su alrededor.

45 Cuando el ensamblaje está sujeto a una fuerza rotacional aplicada, tal como la centrifugación, las respectivas fases de la muestra, tal como la sangre, comenzarán a separarse en una fase más densa desplazada hacia la parte inferior del contenedor de recogida, y la fase menos densa desplazada hacia la parte superior del contenedor de recogida. La fuerza rotacional aplicada impulsará el lastre del separador mecánico hacia el extremo inferior cerrado del contenedor de recogida de muestras y el flotador hacia el extremo superior del contenedor de recogida. Este movimiento del lastre generará una deformación longitudinal del flotador. Como resultado, el flotador y/o el miembro de sellado que se puede deformar resultarán más largos y estrechos y se espaciarán concéntricamente hacia dentro de la superficie interior de la pared lateral cilíndrica del contenedor de recogida. Por consiguiente, los componentes
50 de la fase más ligera de la sangre podrán deslizarse más allá del flotador y/o miembro de sellado que se puede deformar y viajar hacia arriba, e igualmente, los componentes de la fase más pesada de la sangre podrán deslizarse más allá del flotador y viajar hacia abajo.

55 Como se indicó anteriormente, el separador mecánico de la presente invención normalmente tiene una densidad total entre las densidades de las fases separadas. Por consiguiente, el separador mecánico se estabilizará en una posición dentro del contenedor de recogida tal que los componentes de la fase más pesada se ubicarán entre el separador mecánico y el extremo cerrado inferior del contenedor de recogida, mientras que los componentes de la fase más ligera se ubicarán entre el separador mecánico y el extremo superior del contenedor de recogida. Después de que se haya alcanzado este estado estabilizado, se detendrá la centrifugadora y el flotador y/o el miembro de sellado que se puede deformar regresará de manera elástica a su estado neutral y en un compromiso de sellado con
60 el interior de la pared lateral cilíndrica del contenedor de recogida. En una realización adicional. El separador mecánico puede tener una densidad total que es mayor que la densidad de las fases separadas si se integra una parada mecánica dentro del dispositivo en una predeterminada posición por encima de la fase separada más densa.

La densidad del flotador aún debe ser menor que la densidad de las fases separadas, sin embargo, el lastre puede ser de cualquier densidad por encima de la densidad de las fases separadas y no está restringido ni limitado.

Ya que los organismos microbianos normalmente tienen una densidad mayor que los otros componentes de una muestra de sangre, cuando la muestra de sangre es sometida a la centrifugación, cualquier microorganismo presente dentro de la muestra de sangre normalmente se trasladará abajo en el contenedor 82 de recogida de muestras al extremo 88 cerrado inferior durante la fase intermedia. Una vez que cesa la centrifugación y se proporciona el separador mecánico en la posición de sellado, el separador mecánico atrapa de manera efectiva los microorganismos dentro de la segunda fase aislada o la más pesada, formando de este modo una región concentrada de microorganismos que se aísla del resto de muestra de fluido. En una realización, el volumen de cultivo final confinado dentro de la región concentrada de microorganismos está entre 1 y 2000 μl , tal como 1 y 500 μl . En otra realización, el volumen de la segunda fase que forma la región concentrada de microorganismos es menos del 20% del volumen total de muestra de fluido dentro del contenedor de recogida de muestras.

En aún otra realización, se selecciona una característica de flotabilidad del separador 40 mecánico basada en la densidad de toda la muestra de líquido de manera tal que la proporción de volumen de la parte de mayor densidad separada con la parte de menor densidad no es mayor que 1:5. En otra realización, se selecciona una característica de flotabilidad del separador mecánico 40 basada en la densidad de toda la muestra de líquido de manera tal que la proporción de volumen de la parte de mayor densidad separada con la parte de menor densidad no es mayor que 1:10. De esta manera, la relación volumétrica entre las fases de mayor densidad y de menor densidad aisladas se puede determinar en base a una propiedad del separador mecánico 40.

En la práctica, una vez que se ha detectado un cultivo positivo por el elemento de detección en la región de fase aislada, la segunda fase aislada que incluye cualquier microorganismo se puede inocular en un medio de crecimiento estándar y se puede proporcionar dentro de una incubadora, tal como dentro de una Bactec™, disponible comercialmente de Becton, Dickinson y Compañía. El medio de crecimiento se puede cultivar según los procedimientos industriales estándar para determinar la presencia y el tipo de microorganismos presentes dentro de la muestra. En una realización el medio de crecimiento puede estar co-formado con el elemento 91 de detección y proporcionado dentro del contenedor 82 de recogida de muestras.

En una realización, se puede recoger una muestra de sangre de manera directa en el contenedor 82 de recogida que contiene el separador mecánico 40, el reactivo de lisis, y el medio de crecimiento de microorganismos. Este sistema permite la recogida y detección combinada en un único recipiente sin exponer la muestra de sangre a la atmósfera, reduciendo de este modo la contaminación potencial de la muestra. Este sistema reduce también el riesgo de exposición del personal de pruebas del laboratorio a los potenciales patógenos transmitidos por la sangre. En otra realización, como se muestra en la FIG. 23, el contenedor 82 de recogida de muestras puede incluir un primer extremo 401 abierto que tiene un cierre 402 conectado con este y un segundo extremo 403 abierto que tiene un segundo cierre 404 conectado con este. Después de la centrifugación, la primera fase separada más ligera se puede retirar del primer extremo 401 abierto por encima del separador mecánico 40, y la fase separada más densa se puede retirar del segundo extremo 403 abierto por debajo del separador mecánico 40. Como se discutió en otra parte en la presente memoria, el medio de crecimiento puede estar co-formado con el elemento 91 de detección y proporcionado en comunicación con la fase más densa separada adyacente al segundo extremo 403 abierto. Los contenedores de recogida de muestras adicionales que incluyen cierres dobles adecuados para su uso con la presente invención son conocidos, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2005/0059163. En otra realización, el medio de crecimiento se puede proporcionar de manera separada desde el contenedor 82 de recogida de muestras y la segunda fase aislada, que incluye cualquier microorganismo, se puede retirar del contenedor 82 de recogida de muestras e inocular en el medio de crecimiento proporcionado de manera separada. Una vez que ha pasado suficiente tiempo de crecimiento, un elemento 91 de detección microbiana estándar se usa para identificar la presencia y el tipo de microorganismo presente dentro de la muestra inoculada. De acuerdo con una realización de la presente invención, el paso de detección de la presencia o ausencia de un microorganismo ocurre en menos de 24 horas desde el aislamiento de la región concentrada de microorganismos del resto de la muestra de sangre completa. De acuerdo con otra realización de la presente invención, el paso de detección de la presencia o ausencia de un microorganismo ocurre en menos de 8 horas desde el aislamiento de la región microbiana concentrada del resto de la muestra de sangre completa. Se puede lograr una detección más rápida debido al hecho de que los microorganismos están emitiendo productos del metabolismo, tales como gas dióxido de carbono, en un volumen de muestra mucho menor de manera que los cambios en las concentraciones de gases que son detectadas por el elemento de detección ocurren más rápido.

Se ha de notar en la presente memoria que se pueden usar separadores mecánicos alternativos en el presente sistema, que incluyen un separador mecánico 140, como se muestra en las FIG. 12-16. De acuerdo con otra realización de la presente invención, el separador mecánico 140 incluye un fuelle 142 que se puede deformar separado que tiene un extremo superior 144 y un extremo inferior 146 y una parte 148 de sellado dispuesta entre estos que proporciona un compromiso de sellado con una pared lateral 150 del contenedor 182 de recogida de muestras en una posición inicial. El fuelle 142 puede ser extruido y/o moldeado de un material elástico que se puede deformar que presenta buenas características de sellado con el material o los materiales del tubo. El fuelle 142 es generalmente simétrico sobre un eje longitudinal y se puede hacer de cualquier material suficientemente

elastomérico suficiente para formar un sello impermeable al líquido con la pared lateral 150 cilíndrica del contenedor 182 de recogida de muestras. En una realización, el fuelle 142 está hecho de TPE y tiene un espesor dimensional aproximado de desde los 0.508 mm hasta los 1.27 mm (0.020 pulgadas hasta 0.050 pulgadas).

5 El separador mecánico 140 también incluye un flotador 160, que tiene una primera densidad, y que se conecta con una parte del fuelle 142. El separador mecánico 140 también incluye un lastre 162, que tiene una segunda densidad, siendo la segunda densidad mayor que la primera densidad, conectado con una segunda parte del fuelle 142.

10 En la práctica, una cánula 190 de aguja, como se muestra en la FIG. 15, se puede usar para perforar una parte del fuelle 142, tal como una parte 192 de cabeza perforable, como se muestra en la FIG. 12, para introducir una muestra de sangre en el contenedor 182 de recogida de muestras. Como se describe de manera similar anteriormente, tras la aplicación de una fuerza rotacional aplicada, el flotador 160 y el lastre 162 son impulsados en direcciones opuestas lo cual aplica presión al fuelle 142 que se puede deformar y puede provocar el alargamiento del fuelle 142 que se puede deformar. El alargamiento del fuelle 142 que se puede deformar provoca que la parte 148 de sellado se libere del contacto con la pared lateral 150 y permita el paso de fluido a su alrededor, como se discutió anteriormente. Las partes más ligeras de la muestra 189 de sangre, como se muestra en la FIG. 16, se trasladarán hacia arriba en el contenedor 182 de recogida de muestras más allá del fuelle 142 que se puede deformar, mientras que las partes más pesadas de la muestra 187 de sangre, como también se muestra en la FIG. 16, se trasladarán hacia abajo en el contenedor 182 de recogida de muestras más allá del fuelle 142 que se puede deformar. Una vez que cesa la centrifugación, el fuelle 142 que se puede deformar se vuelve a sellar con una parte de la pared lateral 150 del contenedor 182 de recogida de muestras, creando de este modo una barrera efectiva entre la parte 189 más ligera y la parte 187 más pesada formando una región 185 concentrada de microorganismos adyacente al elemento 183 de detección, como se muestra en la FIG. 16. El elemento 183 de detección se puede posicionar dentro del espacio que contiene la segunda fase o la más pesada de la muestra de fluido separada.

15 En una realización, es deseable que el flotador 160 del separador mecánico 140 esté hecho de un material que tenga una densidad más ligera que el líquido destinado a ser separado en dos fases. Por ejemplo, si se desea separar sangre humana en las fases más pesada y más ligera, entonces es deseable que el flotador 160 tenga una densidad de no más de aproximadamente 0.902 gm/cc. En otra realización, el flotador 160 puede estar formado de polipropileno. En otra realización, es deseable que el lastre 162 del separador mecánico 140 esté hecho de un material que tenga una densidad más pesada que el líquido destinado a ser separado en las dos fases. Por ejemplo, si se desea separar sangre humana en las fases más pesada y más ligera, entonces es deseable que el lastre 162 tenga una densidad de al menos 1.326 g/m³. En una realización, el lastre 162 puede estar formado de PET.

20 Características adicionales de estructuras mecánicas similares adecuadas para su uso en la presente invención se muestran y se discuten en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2010/015531 9.

25 En una configuración alternativa, un separador mecánico 240 adecuado para su uso en la presente invención incluye un gradiente de densidad que tiene una región de mayor densidad y una región de menor densidad. Referente a las FIG. 17-18, el separador mecánico 240 puede estar formado de una construcción unitaria en la que una primera región 250 tiene una densidad que es mayor que la del fluido destinado a ser separado, y una segunda región 252 tiene una densidad que es menor que la del fluido destinado a ser separado. En la práctica, el separador mecánico 240 se dimensiona para proporcionar un contacto de sellado con las paredes laterales del contenedor de recogida de muestras (mostrado con referencia a las FIG. 1 y 1A). Como se discutió anteriormente, tras la aplicación de una fuerza rotacional aplicada, la primera región 250 se retira hacia abajo en el contenedor de recogida de muestras y la segunda región 252 se impulsa hacia arriba en el contenedor de recogida de muestras, alargando de este modo el separador mecánico 240 y liberando el sello con la pared lateral del contenedor de recogida de muestras. Una vez que ha cesado la centrifugación, el separador mecánico 240 vuelve a su posición de sellado y establece una barrera de fluido entre la fase más ligera y la más pesada dentro del contenedor de recogida de muestras, como se describe anteriormente.

30 De acuerdo con aún una realización adicional, un separador mecánico 340, como se muestra en las FIG. 19-20, puede incluir una válvula 350 de una vía adecuada para aislar una primera parte de la cámara del interior del contenedor de recogida de muestras de una segunda cámara del interior. La válvula 350 de una vía puede realizar la transición desde una posición cerrada, mostrada en la FIG. 19 en la que una primera parte de la cámara está en aislamiento de fluido de una segunda parte de la cámara, hasta una posición abierta mostrada en la FIG. 20 en la que una parte de la muestra de fluido puede pasar a través de la válvula 350 de una vía desde la primera parte de la cámara a la segunda parte de la cámara. Está destinado en la presente memoria que la válvula 350 de una vía se pueda incorporar en un cuerpo separador mecánico, como se describe en otra parte de la presente memoria, o se pueda proporcionar como un disco formado integralmente con una parte del contenedor de recogida de muestras, tal como dispuesto a lo largo del eje longitudinal. La válvula 350 de una vía puede incluir un material elastomérico que se puede deformar de manera radial que es capaz de realizar la transición desde la posición cerrada a la posición abierta tras la aplicación de una fuerza rotacional aplicada, y volver a realizar la transición desde la posición abierta a la posición cerrada tras el cese de la fuerza rotacional aplicada.

En las Patentes de los Estados Unidos de N° 7,947,236, 6,803,022 y 6,479,298, se describen separadores mecánicos adicionales adecuados para su uso con la presente invención, cada uno asignado a Becton, Dickinson y Compañía.

5 Otras muestras de fluido, tales como la orina, el esputo, la saliva, el fluido cerebroespinal, el fluido pleural, y otros fluidos corporales se pueden usar también en conjunción con la presente invención. En el caso del esputo, la muestra se puede procesar primero mediante métodos convencionales antes de que se introduzca en el contenedor de recogida de muestras que incluye un separador mecánico, un sensor, y un medio de crecimiento de microorganismos. El procesamiento de la muestra de esputo es bien conocido por aquellos expertos en la técnica del cultivo de la tuberculosis. Se ha de notar también que la presente invención se puede usar para aún otras
10 muestras de fluido obtenidas desde muestras industriales, de comida, y de cosméticos para los cultivos microbiológicos.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Las pruebas de los cultivos de sangre fueron realizadas con el *Staph aureus* usando tubos con separadores mecánicos como se describe en la presente memoria con referencia a las FIG. 1-11. Había sensores de oxígeno de estado sólido en las partes inferiores de los tubos. Una mezcla comprendida por 4 ml de medio de crecimiento lítico aeróbico, 4 ml de sangre, y se inocularon 10-100 cfu de organismos en cada tubo. El medio de crecimiento lítico aeróbico contiene saponina como reactivo de lisis y nutrientes de crecimiento para soportar el crecimiento de los microorganismos. Los tubos fueron después centrifugados a 2200x g durante 10 minutos y el separador mecánico giró hacia abajo hacia la parte inferior del tubo, creando aproximadamente 500 µl de espacio para el crecimiento de los organismos. Las curvas de crecimiento de las dos cepas de *Staph aureus* se muestran en la FIG. 21. El tiempo hasta la detección (TTD) para esas dos cepas es de 9 horas, lo que es un 25% más rápido que el TTD de los cultivos de sangre BACTED en Medios Aeróbicos Estándar, que es normalmente de 12 horas.

25 Ejemplo 2: Las pruebas de los cultivos de sangre fueron realizadas con el *Candida glabrata* usando tubos con separadores mecánicos como se describe en la presente memoria con referencia a las FIG. 1-11. Había sensores de oxígeno de estado sólido en las partes inferiores de los tubos. Una mezcla comprendida por 4 ml de medio de crecimiento lítico aeróbico, 4 ml de sangre, y se inocularon 10-100 cfu de organismos en cada tubo. El medio de crecimiento lítico aeróbico contiene saponina como reactivo de lisis y nutrientes de crecimiento para soportar el crecimiento de los microorganismos. Los tubos fueron después centrifugados a 2200x g durante 10 minutos y el separador mecánico giró hacia abajo hacia la parte inferior del tubo, creando aproximadamente 500 µl de espacio para el crecimiento de los organismos. Las curvas de crecimiento de las dos cepas de *Candida glabrata* se muestran en la FIG. 22. El tiempo hasta la detección (TTD) para esas dos cepas es de 14 horas y 18 horas, lo que es un 25% más rápido que el TTD de los cultivos de sangre BACTED en Medios Aeróbicos Estándar.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para detectar la presencia de un microorganismo, que comprende
un contenedor (82) de recogida de muestras que comprende un extremo (90) superior abierto, un extremo inferior (88), y una pared lateral (92) que se extiende entre estos definiendo un interior (94) en este;
- 5 un cierre (84) que se puede conectar con el contenedor (82) de recogida de muestras para sellar el extremo superior (90) abierto;
caracterizado porque el aparato comprende además
un separador mecánico (40) dispuesto dentro del interior (94) y adaptado para separar una muestra de fluido en una primera y una segunda fase dentro del contenedor (82) de recogida de muestras, teniendo el separador mecánico (40) (i) al menos una característica seleccionada de entre un grupo consistente de al menos dos regiones de diferentes densidades y, un gradiente de densidad, (ii) una válvula (350) de una vía, y (iii) al menos una primera parte que se puede deformar de manera radial entre una primera posición en la que el fluido puede pasar entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40) a una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico (40) entra en contacto con la superficie interior de la pared lateral (92) para evitar que el fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40); y
un elemento (91) de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto dentro del interior del contenedor (82) de recogida de muestras.
- 10 2. El aparato de la reivindicación 1, en donde el separador mecánico (40) se deforma de manera radial entre una primera posición en la que la muestra de fluido puede pasar entre una superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40), y una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico (40) entra en contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral (92) evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida y el separador mecánico (40).
- 15 3. El aparato de la reivindicación 1, en donde el separador mecánico (40) comprende:
un fuelle (142) que se puede deformar que tiene un extremo superior (144) y un extremo inferior (146),
y una parte de sellado (148) dispuesta entre estos que proporciona un compromiso de sellado con la pared lateral del contenedor (82) de recogida de muestras;
un flotador (42), que tiene una primera densidad, conectado con una parte del fuelle (142); y
un lastre (44), que tiene una segunda densidad, siendo la segunda densidad mayor que la primera densidad, conectado con una parte del fuelle (142).
- 20 4. El aparato de la reivindicación 1, en donde el separador mecánico comprende un cuerpo (41) del separador que tiene un agujero (46) de paso definido en este, adaptado el agujero (46) de paso para permitir que pase el fluido a través de este, comprendiendo el cuerpo (41) del separador un flotador (42), que tiene una primera densidad, y un lastre (44), que tiene una segunda densidad mayor que la primera densidad, en donde una parte del flotador (42) está conectada con una parte del lastre (44).
- 25 5. El aparato de la reivindicación 4, en donde el separador mecánico (40) se conecta de manera que se pueda liberar con un parte del cierre (84).
- 30 6. El aparato de la reivindicación 4, en donde el separador mecánico (40) se conecta con una parte del cierre (84) en una primera posición inicial, y en donde el separador mecánico (40) se conecta con un parte de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras en una segunda posición de sellado.
- 35 7. El aparato de la reivindicación 1, en donde al menos una parte del separador mecánico (40) se puede deformar de manera radial entre una primera posición en la que el fluido puede pasar entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40), hasta una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico (40) entra en contacto con la superficie interior de la pared lateral (92) para evitar que el fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40),
en donde el separador mecánico (40) se adapta para aislar una región concentrada de microorganismos desde el resto de la muestra de fluido en respuesta a una fuerza rotacional aplicada.
- 40 8. El aparato de la reivindicación 7, en donde el separador mecánico (40) comprende un fuelle (142) que se puede deformar que tiene una parte que se puede deformar de manera radial, un flotador (42) conectado con una parte del
- 45
- 50

fuelle (142) y que tiene una primera densidad, y un lastre (44) conectado con una parte del fuelle (142) y que tiene una segunda densidad, siendo la segunda densidad mayor que la primera densidad, o

5 en donde el separador mecánico (40) comprende un cuerpo separador (41) que tiene un agujero (46) de paso definido en este, agujero (46) de paso adaptado para permitir al fluido pasar a través de este, comprendiendo el cuerpo separador (41) un flotador (42), que tiene una primera densidad, y un lastre (44), que tiene una segunda densidad mayor que la primera densidad, en donde una parte del flotador (42) se conecta a una parte del lastre (44).

9. El aparato de la reivindicación 7, en donde el separador mecánico (40) se conecta de manera que se pueda liberar con una parte del cierre (84).

10. El aparato de la reivindicación 7, en donde el separador mecánico (40) se conecta con una parte del cierre (84) en una primera posición inicial, y en donde el separador mecánico (40) se conecta con una parte de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida de muestras en una segunda posición de sellado.

11. El aparato de la reivindicación 1, en donde el separador mecánico (40) comprende una válvula (350) de una vía y se configura para aislar una primera parte de la cámara del interior (94) de una segunda parte de la cámara del interior (94),

15 en donde la válvula (350) de una vía puede realizar la transición desde una posición cerrada, en la que la primera parte de la cámara está en aislamiento de fluido de la segunda parte de la cámara, a una posición abierta, en la que una parte de la muestra de fluido puede pasar a través de la válvula (350) de una vía desde la primera parte de la cámara a la segunda parte de la cámara.

20 12. El aparato de la reivindicación 11, en donde la válvula (350) de una vía puede realizar la transición desde la posición cerrada a la posición abierta tras la aplicación de una fuerza rotacional aplicada.

13. Un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra de fluido usando el aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:

25 proporcionar una muestra de fluido dentro de un contenedor (82) de recogida de muestras que tiene una pared lateral (92) que define un interior (94) en este, teniendo el interior un separador mecánico (40) adaptado para separar la muestra de fluido en una primera y una segunda fase dentro del contenedor (82) de recogida de muestras y un elemento (91) de detección capaz de detectar la presencia de un microorganismo dispuesto en este.

someter el contenedor (82) de recogida de muestras a una fuerza rotacional aplicada para aislar la región concentrada de microorganismos; y

30 detectar mediante un elemento (91) de detección la presencia o ausencia de un microorganismo dentro de la región concentrada de microorganismos.

35 14. El método de la reivindicación 13, en donde el someter el contenedor (82) de recogida de muestras a una fuerza rotacional aplicada deforma de manera radial el separador mecánico (40) desde una primera posición en la que la muestra de fluido puede pasar entre una superficie interior de la pared lateral (92) de un contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40), a una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico (40) entra en contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral (92) evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral (92) del contenedor (82) de recogida y el separador mecánico (40), creando de este modo una barrera entre la primera y la segunda fase separadas de la muestra de fluido.

40 15. El método de la reivindicación 13, en donde el separador mecánico (40) se adapta para deformarse de manera radial entre una primera posición en la que el fluido puede pasar entre una superficie interior de la pared lateral (90) del contenedor (82) de recogida de muestras y el separador mecánico (40), y una segunda posición en la que al menos una parte del separador mecánico (40) entra en contacto de manera circunferencial con la superficie interior de la pared lateral (90) evitando que la muestra de fluido pase entre la superficie interior de la pared lateral (90) del contenedor (82) de recogida y el separador mecánico (40); y

45 en donde someter el contenedor (82) de recogida de muestras a la centrifugación deforma el separador mecánico (40) hasta la segunda posición de manera tal que el separador mecánico (40) se traslada axialmente dentro del interior (94), y de este modo una parte de mayor densidad de la muestra de fluido se traslada hacia abajo del interior del contenedor (82) de recogida de muestras;

50 comprendiendo además el método el paso de cesar la centrifugación a través del cual el separador mecánico (40) forma una barrera entre la parte de mayor densidad de la muestra de fluido y la parte de menor densidad de la muestra de fluido; y

en donde el elemento (91) de detección detecta la presencia o ausencia de un microorganismo dentro del interior (94) del contenedor (82) de recogida de muestras adyacente a la parte de mayor densidad de la muestra de fluido.

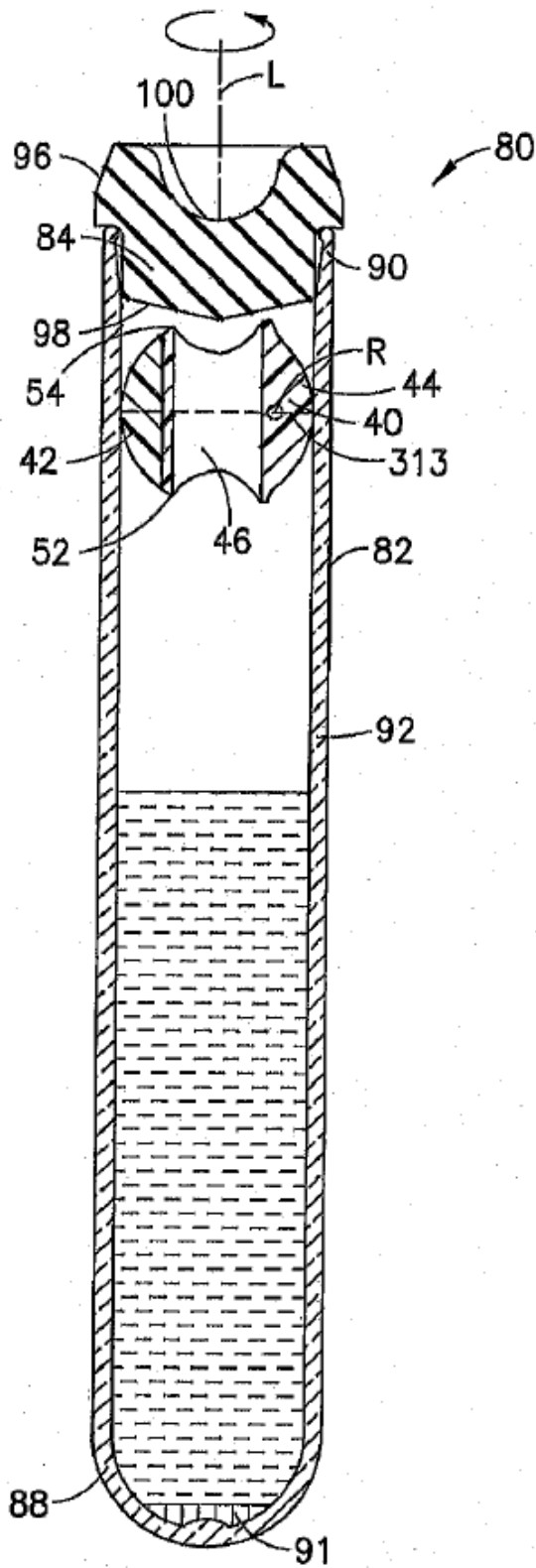


FIG. 1

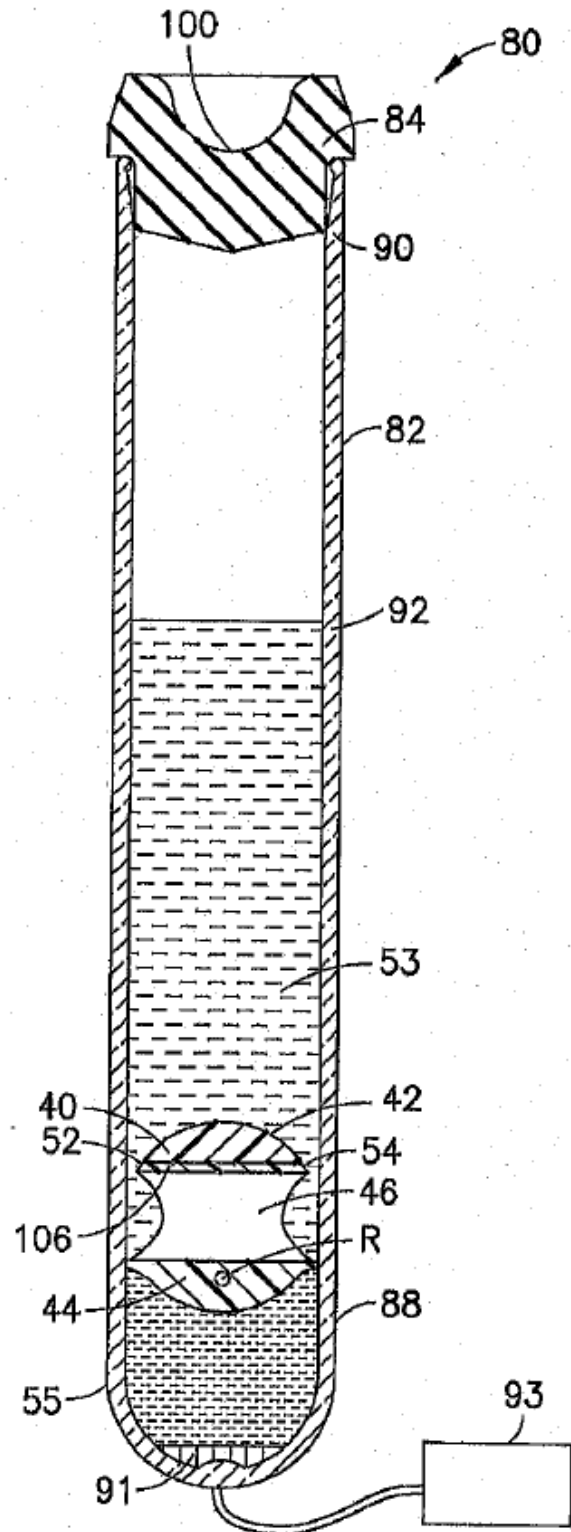


FIG. 1A

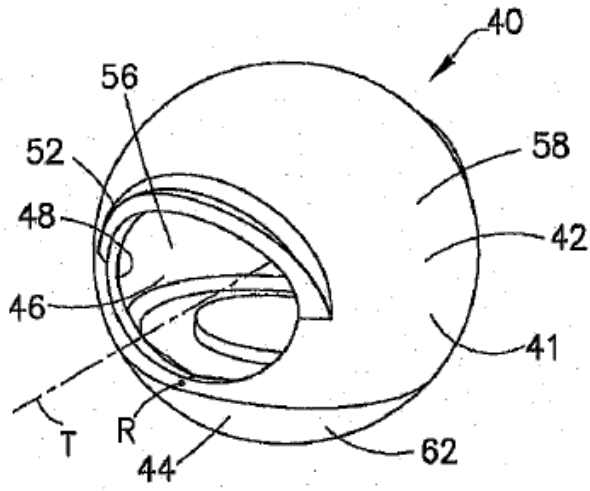


FIG. 2

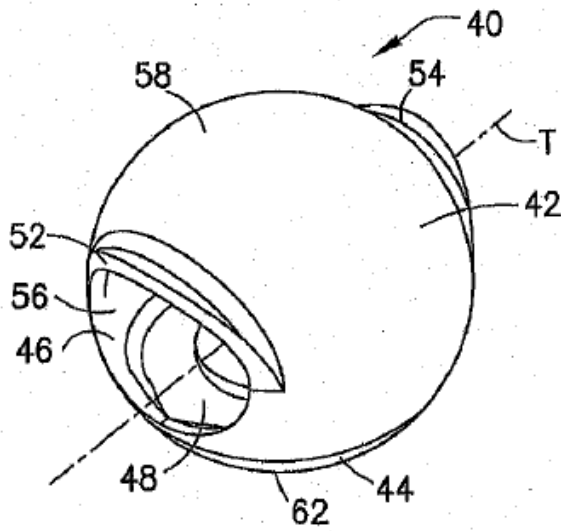


FIG. 3

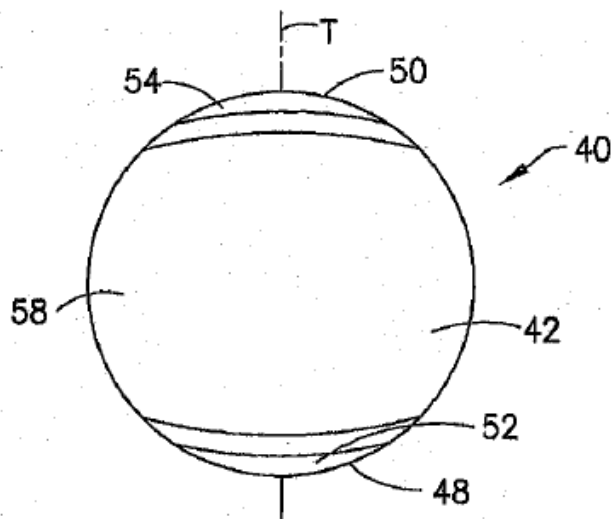


FIG. 4

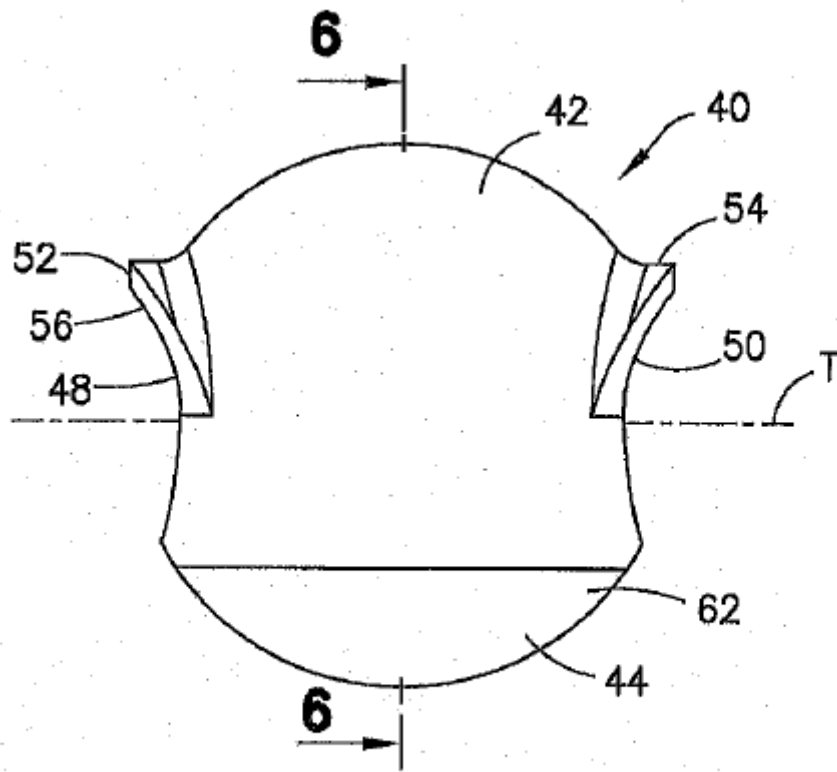


FIG. 5

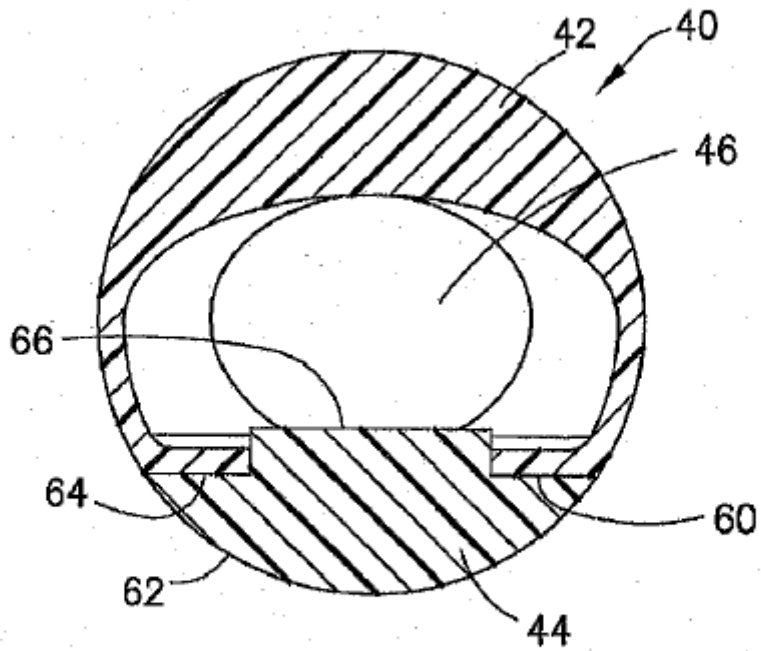


FIG. 6

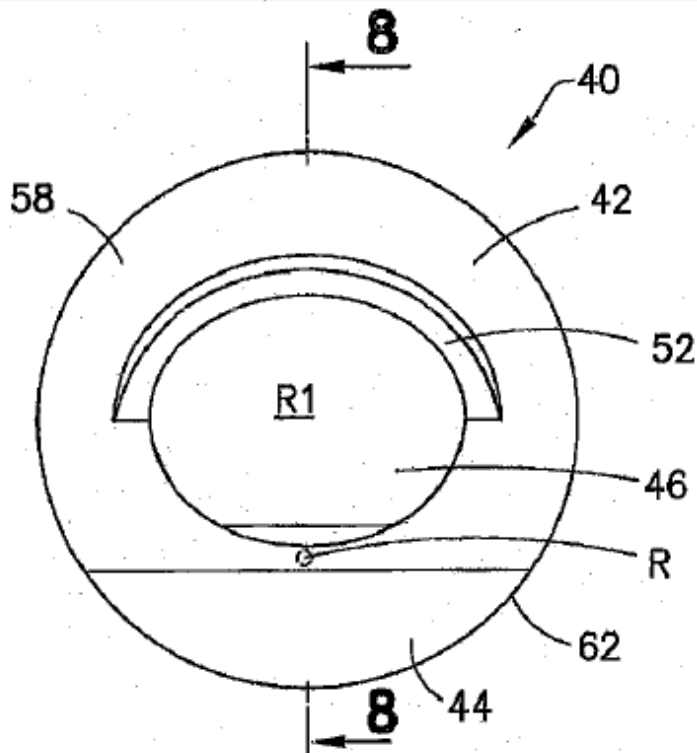


FIG. 7

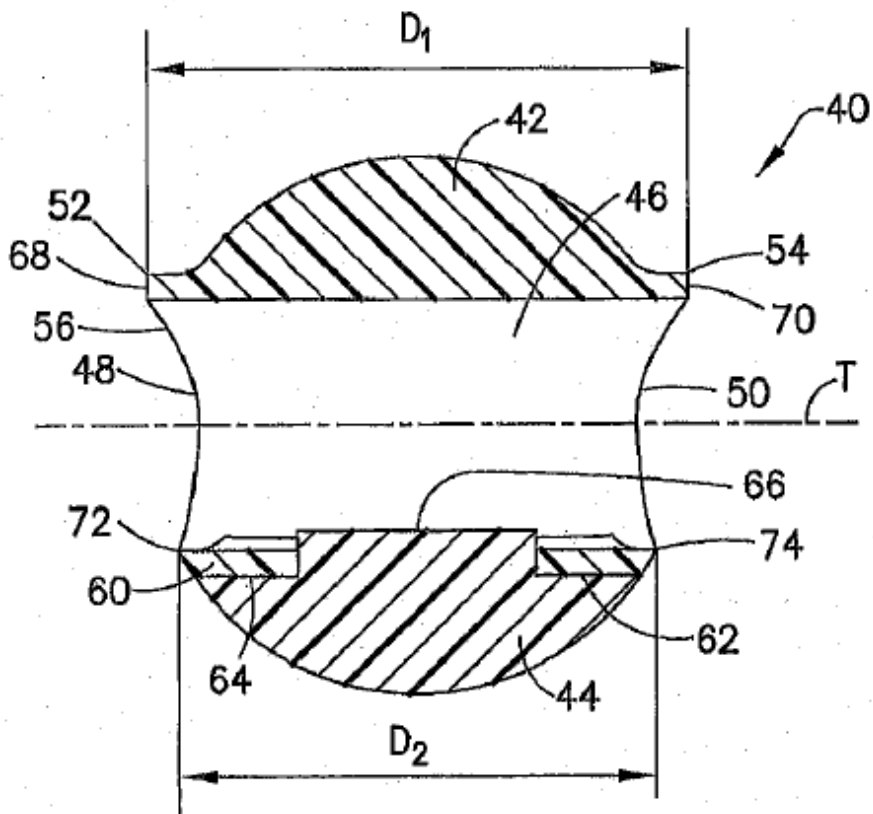


FIG. 8

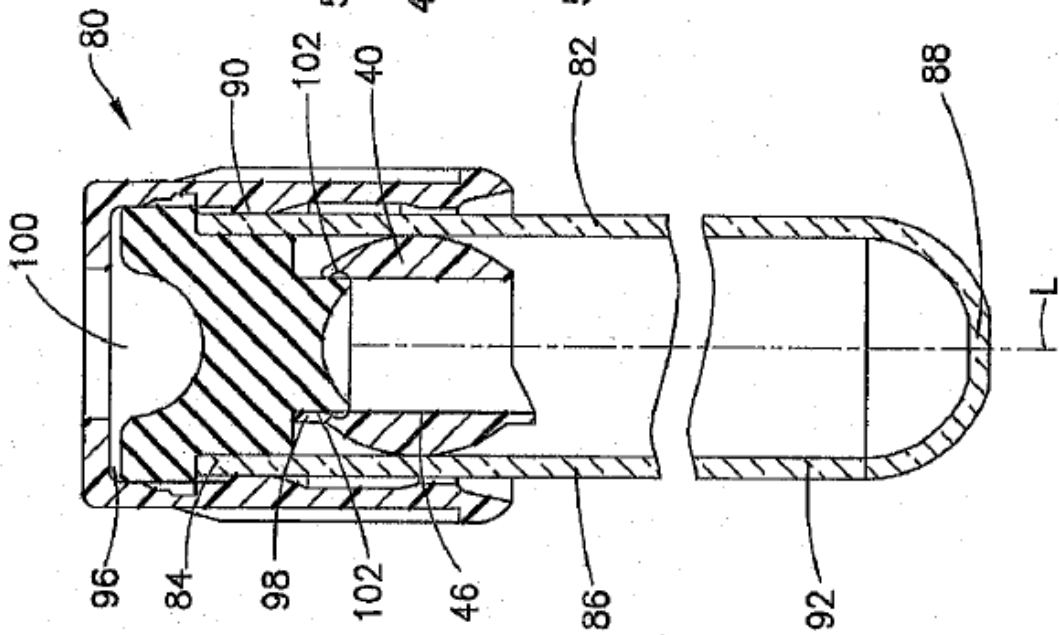


FIG. 9

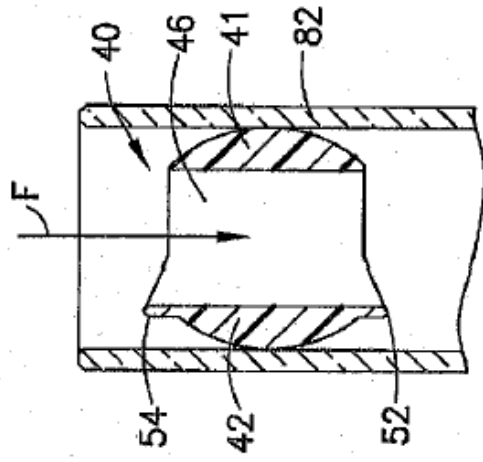


FIG. 10

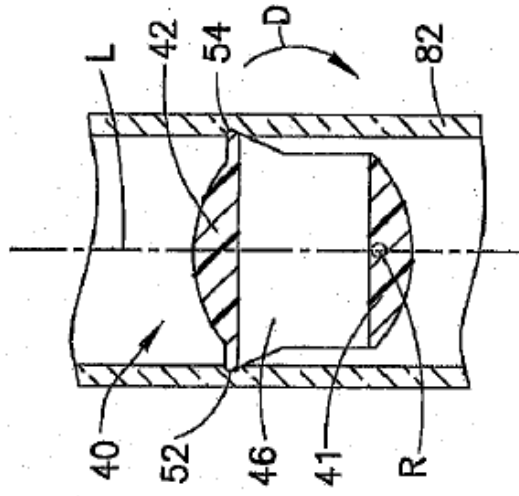


FIG. 11

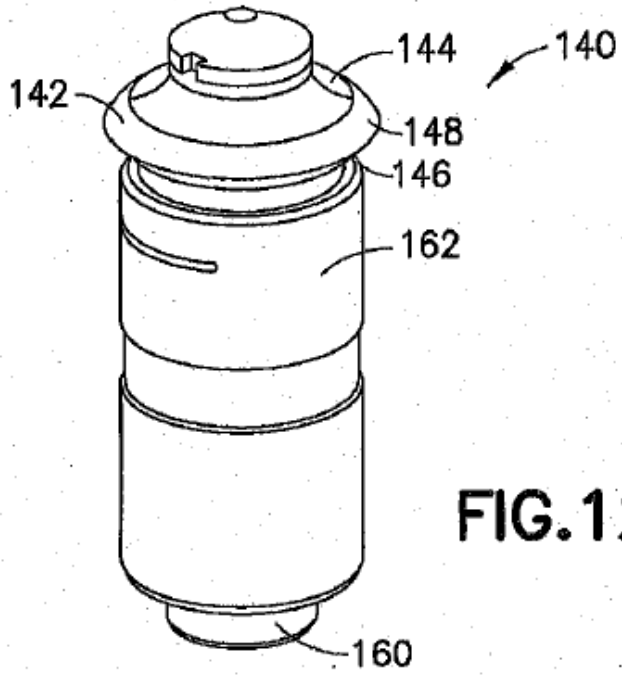


FIG. 12

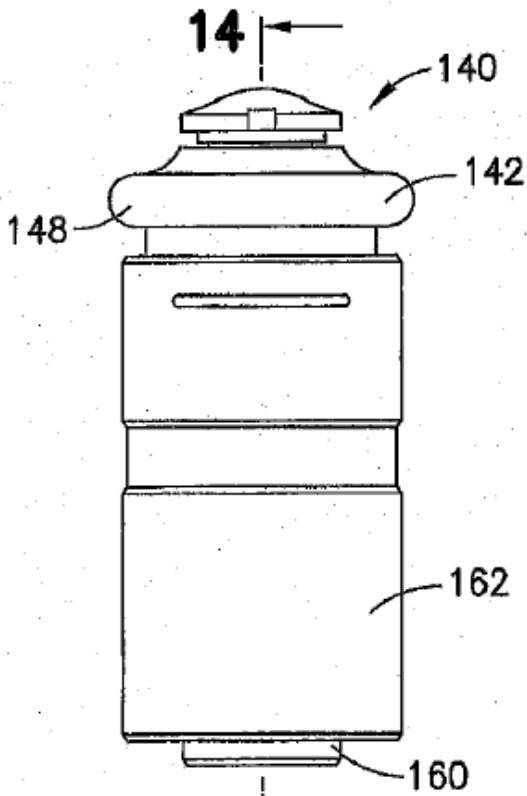


FIG. 13

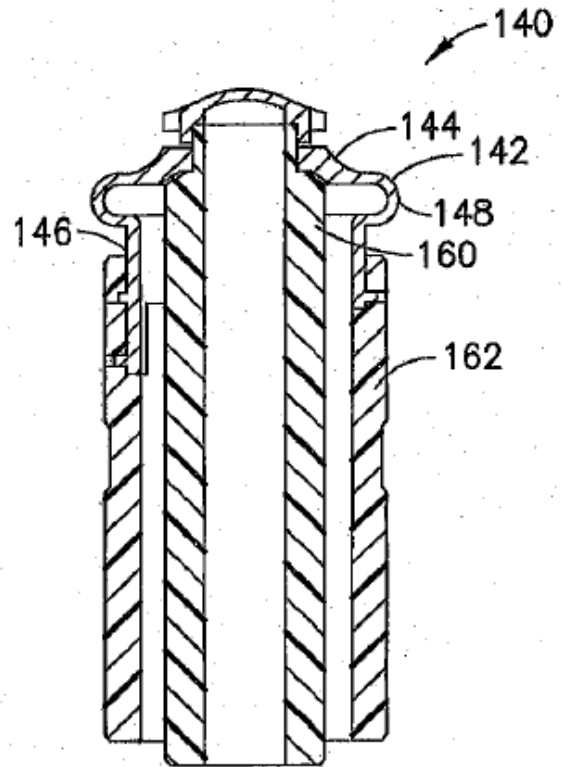


FIG. 14

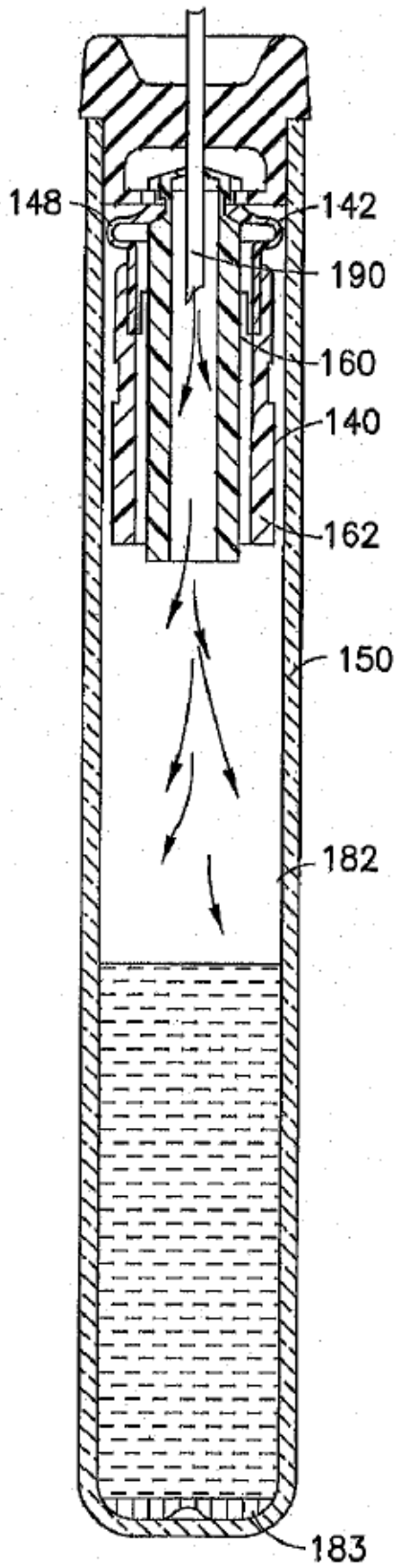


FIG. 15

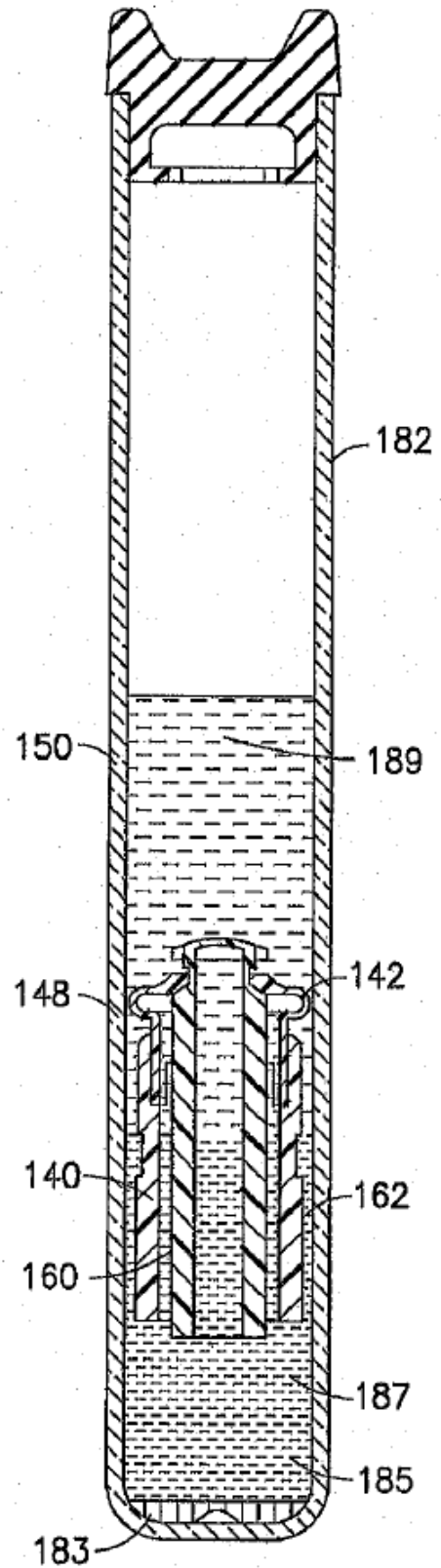


FIG. 16

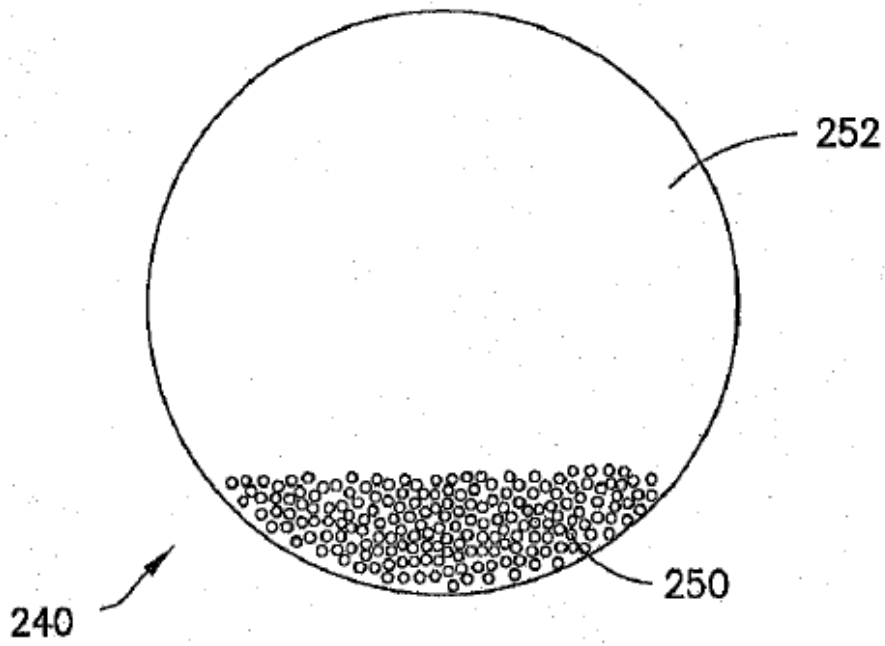


FIG. 17

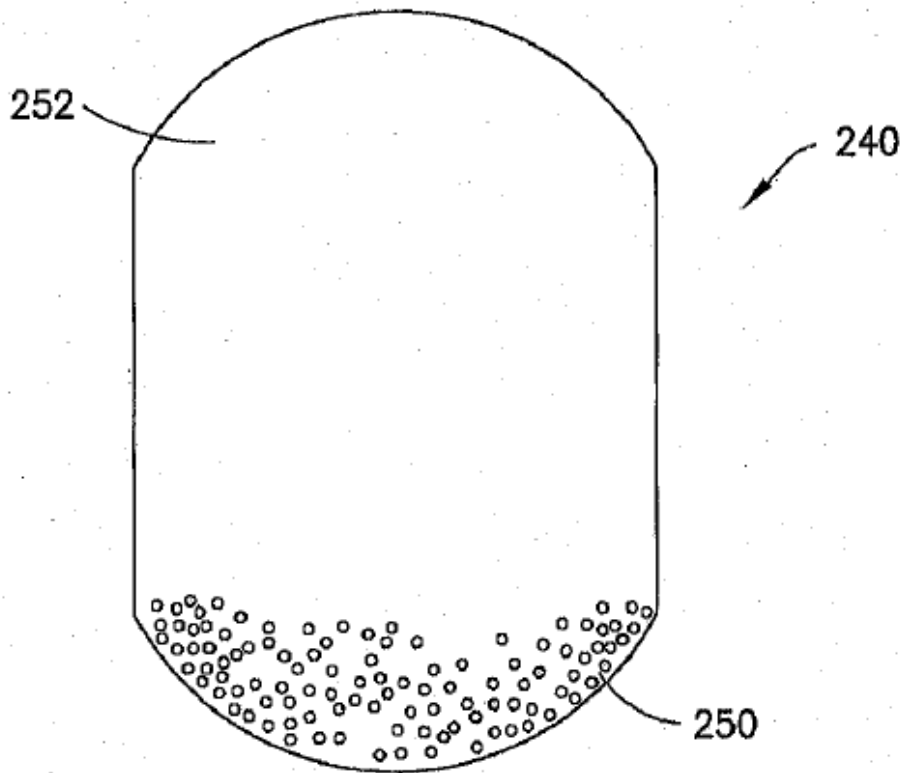


FIG. 18

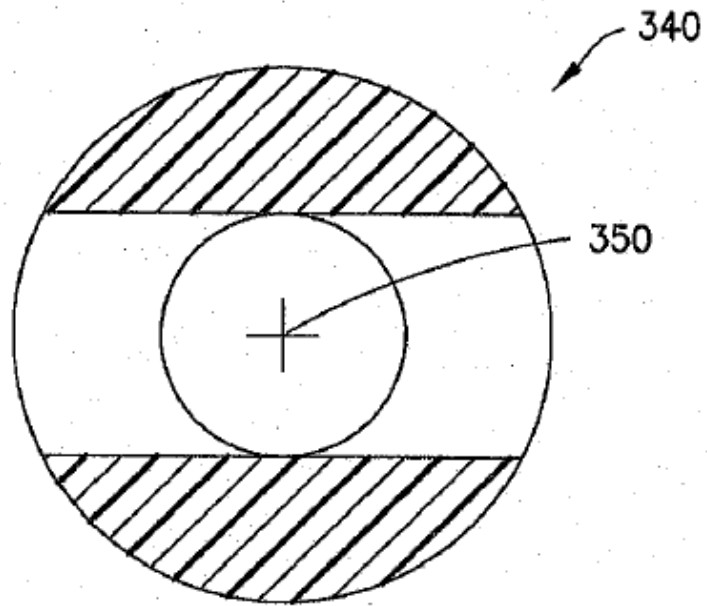


FIG.19

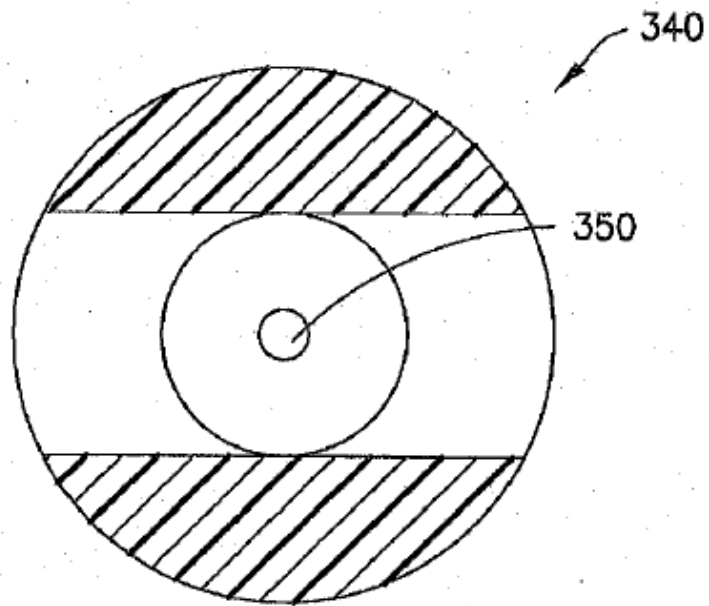


FIG.20

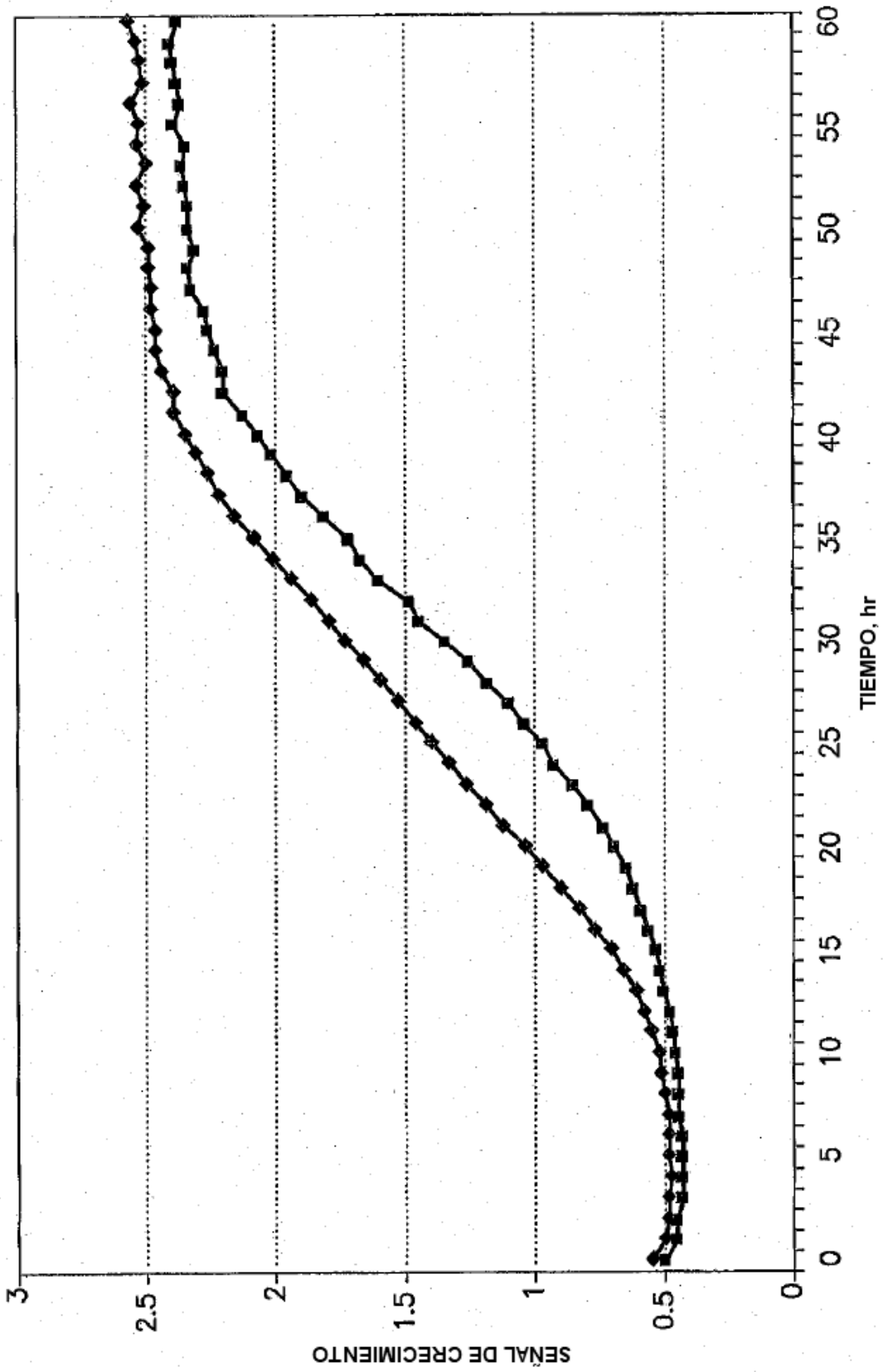


FIG.21

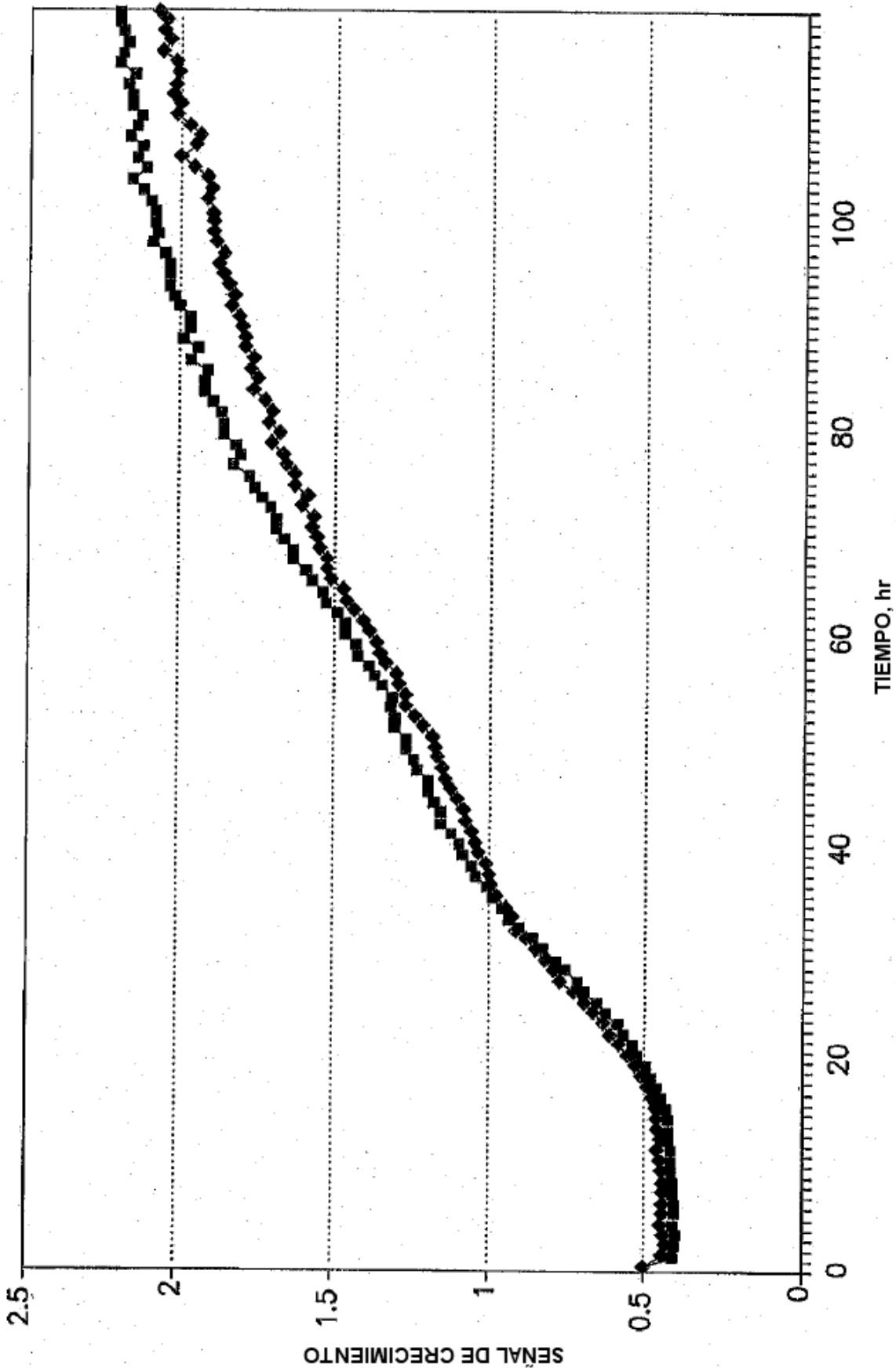


FIG.22

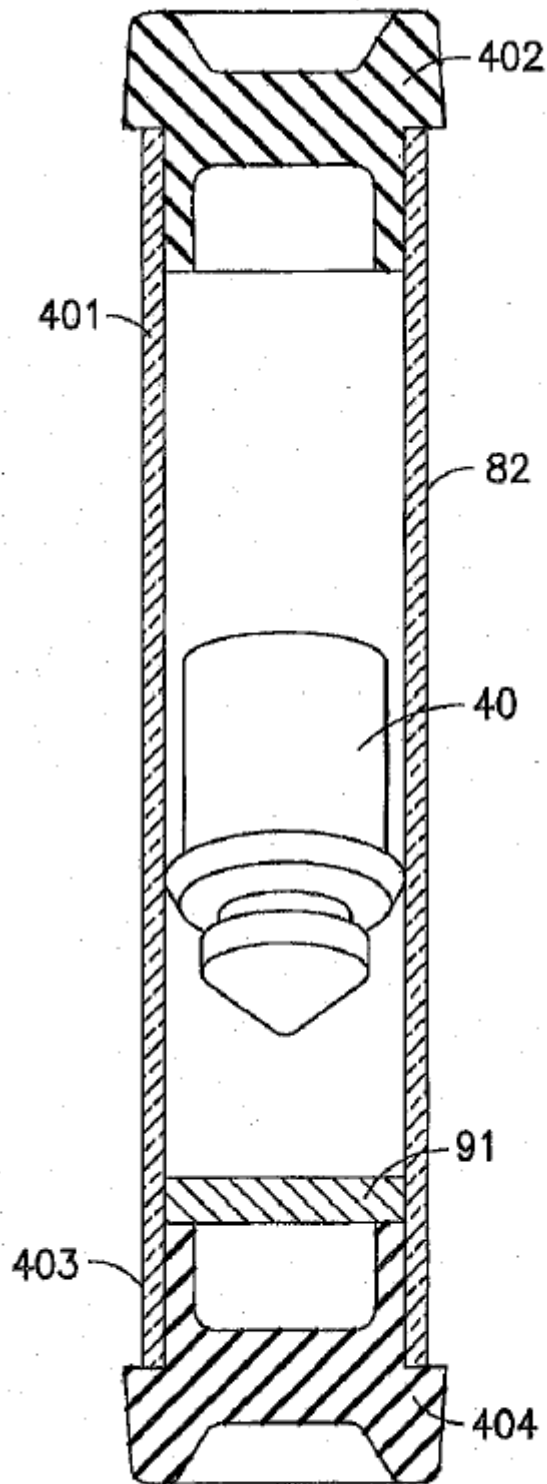


FIG.23