

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 568**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/16 (2006.01)
C12M 1/18 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/US2013/030155**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142786**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13713611 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2972319**

54 Título: **Cartucho de detección bacteriana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2019

73 Titular/es:
BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:
YEH, MING-HSIUNG

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 568 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

Cartucho de detección bacteriana

Campo técnico de la invención

5 La presente descripción pertenece a un aparato para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra. Además, la presente descripción pertenece a un método para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra.

Antecedentes de la invención

10 La sepsis es un importante tema de cuidados de la salud debido a su alta frecuencia de ocurrencia y la alta tasa de mortalidad en hospitales. La sepsis está caracterizada por un estado inflamatorio en todo el cuerpo, denominado una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), y por la presencia de una infección conocida o sospechada. El sistema inmune puede provocar esta respuesta inflamatoria como una consecuencia de microbios en la sangre, orina, pulmones, piel u otros tejidos, por ejemplo. Una de las causas principales de la sepsis es una infección de la sangre (BSI). La BSI es más comúnmente diagnosticada por un cultivo de sangre, en el cual una muestra de sangre es incubada con un medio en una atmósfera controlada para promover el crecimiento bacteriano.

15 Los sistemas actuales automatizados de cultivo de la sangre pueden llevar de 12-48 horas para detectar la presencia de microorganismos infecciosos en la sangre y puede llevar hasta 5 días para descartar la presencia de cualesquiera organismos infecciosos. Puede llevar hasta otras 12-48 horas identificar los microorganismos infecciosos mediante un subcultivo del cultivo de sangre positivo y realizar los ensayos de identificación y de susceptibilidad antimicrobiana. Estos resultados pueden ser muy tardíos para alterar el curso del tratamiento y el resultado es la muerte del paciente.

20 Un enfoque para acelerar el tiempo de detección bacteriana ("TTD") es dividir el líquido de la muestra junto los medios de crecimiento en un gran número de muestras de volumen más pequeñas que están contenidas en compartimentos de pequeño volumen cerrados (véanse las Patentes de EEUU N° 5.770.440 y 5.891.739 de Berndt). El documento 0 751 216 describe un contenedor de muestras que comprende un contenedor ópticamente transparente para contener un espécimen y un medio de cultivo, una placa de cubierta y un gas de cultivo esterilizado.

25 Los pasos añadidos requeridos para segregar la muestra de sangre/medios en muestras de un volumen menor puede ser difícil y llevar mucho tiempo. Adicionalmente, el diseño de un producto para responder a este mayor flujo de trabajo puede ser limitado por motivos de posibilidad de fabricación y coste. En consecuencia, se desea un diseño de un producto BSI de un compartimento de pequeño volumen que sea fácil de fabricar, económico, con un menor consumo de tiempo para usar y que reduzca el TTD en una muestra clínica.

Breve resumen de la invención

35 Los anteriores y otros objetos pueden ser proporcionados por un aparato de acuerdo con la reivindicación 1 y un método de acuerdo con la reivindicación 8. Otras realizaciones se exponen en las reivindicaciones dependientes, en la siguiente descripción y en los dibujos.

Como tal, la presente descripción se refiere a un aparato para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra, comprendiendo el aparato:

una tapa del contenedor que tiene una pluralidad de grupos de paredes salientes hacia abajo;

40 una bandeja del contenedor adaptada para recibir una muestra y para ser ensamblada con la tapa del contenedor en una primera posición y en una segunda posición; y

45 una pluralidad de barras que salen hacia arriba desde la bandeja del cartucho y una pluralidad de aberturas de ventilación formadas en la tapa del contenedor, en donde las aberturas de ventilación están adaptadas para recibir las respectivas barras, y para permitir que las barras avancen al interior de las aberturas de ventilación, estando las barras dimensionadas para sellar las respectivas aberturas de ventilación cuando están totalmente avanzadas en ellas;

en donde cuando están en la primera posición, los compartimentos definidos por los grupos de paredes salientes hacia abajo en la tapa del contenedor están abiertos entre sí permitiendo de este modo que la muestra fluya de un compartimento a otro dentro de la bandeja del contenedor;

50 en donde, cuando están en la segunda posición, los compartimentos están sellados entre sí, estando cada porción de muestra confinada en su compartimento respectivo, estando cada compartimento definido por un grupo de paredes salientes hacia abajo, la tapa del contenedor desde la cual se extienden las paredes salientes hacia abajo, y la bandeja del cartucho.

Como tal, la presente descripción se refiere también a un método para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra, comprendiendo el método los pasos de:

- proporcionar una tapa del contenedor con una pluralidad de grupos de paredes que salen hacia abajo;
- 5 proporcionar una bandeja del contenedor con uno o más sensores, estando la bandeja del contenedor adaptada para ser ensamblada con la tapa del contenedor de modo que las paredes salientes hacia abajo definan una pluralidad de compartimentos en la bandeja del contenedor y al menos uno de cada uno de los uno o más sensores esté dispuesto en cada una de al menos una porción de la pluralidad de compartimentos y en donde, en la primera posición, los compartimentos definidos por las paredes que salen hacia abajo estén abiertos entre sí;
- 10 ensamblar la tapa del contenedor en la bandeja del contenedor en una primera posición;
- introducir una muestra en el conjunto;
- 15 mover el conjunto desde la primera posición a una segunda posición en donde en la segunda posición los compartimentos están cerrados entre sí y las porciones de la muestra en cada compartimento están aisladas entre sí, en donde el paso de mover el conjunto desde la primera posición a la segunda posición comprende además avanzar al menos una barra que sale hacia arriba desde la bandeja del contenedor a un acoplamiento sellado con una correspondiente abertura de ventilación en la tapa del contenedor; e
- interrogar al sensor para determinar al menos una de la presencia o la ausencia de un microorganismo en la muestra o, si un microorganismo está presente, su respuesta a un estado o a un reactivo al cual es sometida la muestra.

20 Lo que aquí se describe es por lo tanto un método y un aparato para la detección rápida de microorganismos en muestras biológicas (por ejemplo sangre) mediante un análisis para determinar la presencia o ausencia de microorganismos infecciosos en las muestras. El aparato incluye un cartucho con una tapa y una bandeja, un mecanismo para aislar una muestra en masa de varias muestras más pequeñas, y un sensor dispuesto en la bandeja para determinar la presencia o ausencia de microorganismos.

25 De acuerdo con el método aquí descrito, la tapa del cartucho está ensamblada sobre la bandeja del cartucho en una primera posición, la muestra es introducida en la bandeja del cartucho y es permitida distribuirse en todo el volumen de la bandeja del cartucho, y la tapa del cartucho es movida a una segunda posición creando una pluralidad de compartimentos que aíslan la muestra en masa en varias de un volumen menor. El método y el aparato permiten, entre otras cosas, un tiempo reducido para la detección de microorganismos en una muestra biológica y obvia la
30 necesidad de dispensar manualmente una muestra en compartimentos individuales de un dispositivo de detección.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una vista en perspectiva de un aspecto de una porción superior e inferior de la tapa de una tapa del cartucho.

35 La Figura 2 muestra una vista en perspectiva de las porciones superior e inferior de la tapa de la Figura 1 ensambladas conjuntamente.

La Figura 3 muestra una vista en perspectiva de una porción de una bandeja del cartucho.

La Figura 4 muestra una vista en perspectiva del conjunto de la tapa del cartucho de la Figura 2 acoplado a la bandeja del cartucho de la Figura 3 en una primera posición.

40 La Figura 5 muestra una vista en perspectiva del conjunto de la tapa del cartucho de la Figura 2 acoplado a la bandeja del cartucho de la Figura 3 en una segunda posición.

La Figura 6 muestra una vista en perspectiva de toda la porción superior de la tapa del cartucho mostrado en la Figura 1.

La Figura 7 muestra una vista en perspectiva de toda la porción inferior de la tapa del cartucho mostrado en la Figura 1.

45 La Figura 8 muestra una vista en perspectiva de una transparencia de las porciones superior e inferior de la tapa del cartucho mostrado en las Figuras 6 y 7 antes de su ensamblaje.

La Figura 9 muestra una vista en perspectiva de una transparencia de las porciones superior e inferior de la tapa del cartucho mostrado en la Figura 8 ensambladas.

La Figura 10 muestra una vista en perspectiva de toda la bandeja del cartucho mostrado en la Figura 3.

La Figura 11 muestra una vista lateral en planta del conjunto de la tapa del cartucho y de la bandeja del cartucho mostrado en la Figura 8 antes del ensamblaje.

La Figura 12 muestra una vista lateral en planta del conjunto de la tapa del cartucho y de la bandeja del cartucho ensambladas en una primera posición, con una vista ampliada de los dispositivos de acoplamiento.

5 La Figura 13 muestra los pasos de la recogida de una muestra de sangre.

La Figura 14 muestra una vista lateral de una muestra que es introducida en la tapa del cartucho y la bandeja en la primera posición.

La Figura 15 muestra una vista lateral de la tapa del cartucho y de la bandeja pasando de una primera posición a una segunda posición.

10 Las Figuras 16A-B muestran aire escapando de la bandeja del cartucho durante la transición de la primera posición a la segunda posición.

La Figura 17 muestra una vista esquemática del cartucho pasando por una detección bacteriana.

La Figura 18 muestra una vista superior en planta de un aspecto alternativo del conjunto de la tapa del cartucho mostrado en la Figura 9 con unas vistas ampliadas de los compartimentos individuales.

15 La Figura 19 muestra una vista lateral en planta de un aspecto alternativo de la tapa del cartucho y de la bandeja del cartucho de la Figura 13 ensambladas en una primera posición.

La Figura 20 muestra una vista lateral en planta de la tapa del cartucho y de la bandeja del cartucho de la Figura 20 llena con la muestra y aceite.

20 La Figura 21A muestra una vista superior en planta de un aspecto alternativo de la tapa del cartucho y de la bandeja del cartucho en una primera posición.

La Figura 21B muestra una vista superior en planta de la tapa del cartucho y de la bandeja de la Figura 21A en una segunda posición.

La Figura 22A muestra una vista superior en planta de un aspecto alternativo de una tapa del cartucho y de una bandeja en una primera posición.

25 La Figura 22B muestra una vista superior en planta de un aspecto alternativo de una tapa del cartucho y de una bandeja en una primera posición.

La Figura 23 muestra una vista en perspectiva de una transparencia de un cartucho de detección bacteriana con porciones omitidas.

La Figura 24 muestra una vista de la sección del cartucho de la Figura 23 a lo largo de un diámetro del cartucho.

30 Las Figuras 25A-B muestran una vista de la sección del cartucho de la Figura 23 durante y después de la introducción de la muestra, respectivamente.

La Figura 26A muestra una vista de la sección del cartucho lleno de la Figura 25B en una segunda posición.

La Figura 26B muestra el cartucho lleno de la Figura 26A después de que aberturas de ventilación sean selladas.

La Figura 27 muestra dos cartuchos del tipo ilustrado en la Figura 24 en una configuración apilada.

35 **Descripción detallada**

Con referencia generalmente a las Figuras 1-5, un cartucho 10 de detección bacteriana de acuerdo con un aspecto de la invención incluye generalmente un conjunto 16 de la tapa del cartucho y una bandeja 18 del cartucho. El conjunto 16 de la tapa del cartucho está compuesto por una porción 12 de la tapa superior y una porción 14 de la tapa inferior que pueden estar hechas separadamente, por ejemplo mediante un moldeo por inyección, y juntas a presión para formar el conjunto 16 de la tapa del cartucho. El conjunto 16 de la tapa del cartucho es a continuación situado sobre la bandeja 18 del cartucho en una primera posición elevada (Figura 4). El conjunto 16 de la tapa del cartucho puede entonces ser empujado hacia abajo para bloquear el cartucho 10 de detección bacteriana en una segunda posición (Figura 5) después de que la muestra 66 (Figura 16) haya sido introducida en la bandeja 18 del cartucho a través de un puerto 20 de inyección de muestras (Figura 1) definido en la porción 12 de la tapa superior.

40 En un aspecto el cartucho 10 de detección bacteriana que contiene la muestra 66 está preparado para la incubación de la muestra. Todos los compartimentos 24 están configurados para permitir la retirada de la muestra cuando la bandeja está en la segunda posición. Por lo tanto, se puede acceder a cualquier compartimento 24 con la muestra 66 para la cual se obtuvo un resultado de detección positivo para la retirada de la muestra para análisis posteriores.

Con referencia generalmente a las Figuras 1-2, el conjunto 16 de la tapa del cartucho incluye una porción 12 de la tapa superior y una porción 14 de la tapa inferior. La porción 12 de la tapa superior incluye varias aberturas 22 de acceso superiores de la tapa situadas cerca del centro de cada compartimento 24 de la porción 14 de la tapa inferior. Las aberturas 22 de acceso a la tapa superior permiten que una pipeta, jeringa u otro dispositivo accedan a la muestra 66 dentro de un compartimento seleccionado 24. Las aberturas 22 de acceso de la tapa superior están integradas en la tapa superior 12 como áreas circulares delgadas. Un puerto 20 de inyección de muestras está formado en la porción 12 de la tapa superior para permitir que una muestra 66 sea introducida en la bandeja 18 del cartucho. El puerto está configurado para permitir la introducción de la muestra en el conjunto de la tapa por medio de una jeringa u otro dispositivo de introducción de la muestra. Una salida 42 resellable de escape de la presión separada está también dispuesta sobre la porción 12 de la tapa superior (mostrada en las Figuras 6-12).

La porción 14 de la tapa inferior define los compartimentos 24 en cooperación con la bandeja 18 del cartucho. Específicamente, cada compartimento 24 está definido por cuatro porciones 24a-d de las paredes laterales que salen hacia abajo en la porción 14 de la tapa inferior, la pared superior 24e de la porción 14 de la tapa inferior, y la bandeja 18 del cartucho. En otras palabras, la tapa inferior define una rejilla de compartimentos 24 excepto para la superficie inferior de los compartimentos, la cual está definida por la bandeja 18 del cartucho. La porción 14 de la tapa inferior incluye también varias aberturas de acceso 26 de la tapa inferior situadas en el aspecto ilustrado cerca del centro de cada compartimento 24 y alineadas con una correspondiente abertura 22 de la tapa superior. La alineación de las aberturas 22 de acceso con las aberturas 26 de acceso de la tapa inferior permite que un dispositivo de acceso, tal como una pipeta o una jeringa, penetren a través de la porción 12 de la tapa superior y de la porción 14 de la tapa inferior para acceder al compartimento 24 debajo de ellas. También están incluidas en la porción 14 de la tapa inferior las aberturas de ventilación 28 de cada compartimento 24. Las aberturas de ventilación 28 se alinean con las barras de sellado 30 sobre la bandeja 18 del cartucho.

Las aberturas 22 de acceso de la tapa superior pueden estar cubiertas con una cinta metálica 72 adhesiva sensible a la presión (mostrada en la Figura 18) para aislar el interior del cartucho 10 de detección bacteriana del medio ambiente. En uso, después de que el dispositivo de acceso penetre en las porciones 12, 14 de las tapas superior e inferior para acceder al compartimento 24, las aberturas 22 de acceso de la tapa superior pueden ser selladas de nuevo, por ejemplo con una capa adicional de una cinta metálica 72 adhesiva sensible a la presión, para de nuevo aislar el interior del cartucho 10 del medio ambiente para facilitar un manejo seguro, que incluye el desecho y/o el tratamiento en autoclave. Además de reducir las posibilidades de contaminación, la disposición de un sellado mantiene los componentes de la muestra dentro del compartimento 24. Por ejemplo, sin un sellado, el CO₂ podría escapar del compartimento 24, haciendo que el sensor 36 (descrito más adelante) diera unos resultados inexactos del metabolismo bacteriano. De igual manera, las aberturas 26 de acceso de la tapa inferior pueden inicialmente ser selladas por un material tal como una cinta metálica adhesiva sensible a la presión (no ilustrada). Un sellado en las aberturas 26 de acceso de la tapa inferior aísla el contenido de un compartimento particular 24 del espacio superior entre la porción 12 de la tapa superior y la porción 14 de la tapa inferior cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho está en la segunda posición, descrita más completamente más adelante.

Con referencia generalmente a las Figuras 3-5, la bandeja 18 del cartucho es una bandeja con unas barras de sellado 30 y un recipiente 32 interior abierto hecho sobre la superficie. El recipiente 32 está configurado para recibir unos reactivos tales como unas pastillas 34 de gel de resina. Las barras de sellado 30 funcionan para guiar el conjunto 16 de la tapa del cartucho sobre la bandeja 18 del cartucho, y sirven para sellar las aberturas de ventilación 28 de los compartimentos 24 cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho es movido desde la primera posición a la segunda posición. En un aspecto, el recipiente es un borde elevado sobre la superficie de la bandeja 18 del cartucho. En otros aspectos las pastillas 34 de gel de resina pueden ser aplicadas directamente a la bandeja del cartucho sin el uso de los recipientes 32. La situación exacta y el número de los recipientes 32 y de las barras de sellado 30 son determinadas por la disposición de los compartimentos 24 en la porción 14 de la tapa inferior y es en gran medida una cuestión de la elección del diseño. La bandeja 18 del cartucho, la porción 12 de la tapa superior, y la porción 14 de la tapa inferior pueden estar hechas de diversos materiales, tales como polipropileno claro o resinas ópticamente claras similares tales como, pero no limitadas a, policarbonato, polímero de olefina cíclica, y poliestireno. Aunque se prefiere que la porción 12 de la tapa superior y la porción 14 de la tapa inferior sean un material transparente, se consideran otros materiales no transparentes para uso en el conjunto aquí descrito.

En un aspecto, la bandeja 18 del cartucho es precargada con un revestimiento biosensor 36 sobre la superficie inferior 37 fuera del área de los recipientes interiores abiertos 32. Aunque se prefiere un revestimiento biosensor 36 para el sensor, se pueden usar otros sensores conocidos en la técnica.

El sensor 36 puede detectar, por ejemplo, cambios de O₂ y/o CO₂ colectiva o independientemente (véase la Patente de EEUU N° 6.989.246 de Yeh). Las pastillas 34 de gel de resina son dispensadas dentro del interior de los recipientes abiertos 32. La pastilla de gel de resina está hecha de, por ejemplo, resina de adsorción antimicrobiana mezclada con materiales solubles en agua para facilidad de dispensación y capacidad de liberación de resina en un medio ambiente acuoso. Tales resinas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.624.814 de Waters y otros describe unas resinas añadidas a medios de cultivo para aislar microorganismos de sustancias que tienen el potencial de inhibir el crecimiento de los microorganismos. Otras referencias que consideran la combinación de una resina con una muestra biológica para eliminar los inhibidores del crecimiento de una muestra

biológica sospechosa de contener un microorganismo objetivo incluyen las Patentes de EEUU N^{os} 4.145.304 y 4.174.277, ambas de Melnick y otros.

5 Con referencia a las Figuras 6 y 7, la porción 12 de la tapa superior y la porción 14 de la tapa inferior incluyen también unas aberturas de poste por presión 38 y de cierre de poste por presión 40, respectivamente, para permitir que la porción 12 de la tapa superior se cierre a presión en la porción 14 de la tapa inferior a fin de formar el conjunto 16 de la tapa del cartucho, como está ilustrado en la Figura 2.

10 Como se ha advertido previamente, una vez que el conjunto 16 de la tapa del cartucho está situada sobre la bandeja 18 del cartucho en la segunda posición, se forma una rejilla de compartimentos segregados 24. Las aberturas de ventilación 28 y la salida 42 de escape de la presión mantienen las condiciones del compartimento deseadas durante el proceso de inyección de la muestra y la acción de "empujar hacia abajo" del conjunto 16 de la tapa del cartucho sobre la bandeja 18 del cartucho. Las aberturas de ventilación 28 permiten que la presión entre los compartimentos se equilibre. La salida 42 de escape de la presión está configurada para permitir que el cartucho 10 de detección bacteriana se ventile si la presión está por encima de un umbral predeterminado.

15 Las barras de sellado 30 en la bandeja 18 del cartucho están situadas de modo que cada compartimento 24 esté contiguo a al menos una barra de sellado 30. La barra de sellado 30 en cada compartimento 24 está alineada con la abertura de ventilación 28 de la porción 14 de la tapa inferior. La barra de sellado 30 tiene un diámetro que permite que la barra de sellado 30 se acople dentro de la abertura de ventilación 28. La longitud de la barra de sellado 30 es tal que, cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho está en la segunda posición, la barra de sellado 30 en la bandeja 18 del cartucho sella la abertura de ventilación 28. Esto está ilustrado en las Figuras 16A-B. La salida 42 de escape de la presión en la porción 12 de la tapa superior es mantenida abierta durante la inyección de la muestra y la operación de empuje hacia abajo. Hay que advertir que la salida 42 de escape de la presión en la porción 12 de la tapa superior descansa sobre la abertura 43 en la porción 14 de la tapa inferior para permitir la liberación de presión a través de la porción 14 de la tapa inferior. La salida 42 de escape de la presión es a continuación sellada de nuevo para la incubación del cartucho 10 de detección bacteriana cargado. Esto puede ser realizado, por ejemplo, con el uso de una cinta metálica 45 resellable.

Con referencia generalmente a las Figuras 6-10, se ilustran diversos aspectos del cartucho 10 de detección bacteriana de acuerdo con un aspecto de la descripción que incluyen la porción 12 de la tapa superior, la porción 14 de la tapa inferior, del conjunto 16 de la tapa del cartucho, y la bandeja 18 del cartucho.

30 Como está ilustrado en las Figuras 6-9, el puerto 20 de inyección de muestras comprende una abertura 19 de inyección de muestras en la porción 12 de la tapa superior que está alineada con un tabique 21. El tabique 21 se asienta en un compartimento 23 del tabique formado en la porción 14 de la tapa inferior.

35 Otras características ilustradas en las Figuras 6-10 que no están ilustradas en las Figuras 1-5 incluyen la salida 42 de escape de la presión previamente descrita, el bloque elevado 44, y el distribuidor 46 de muestras de entrada elevado. Como se ha descrito antes, la salida 42 de escape de la presión permite la igualación de la presión durante la introducción de la muestra y cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho es movido desde la primera posición a la segunda posición. La porción 14 de la tapa inferior también contiene una porción abierta 43 que está alineada con la salida 42 de escape de la presión en la porción 12 de la tapa superior para permitir que la presión se escape del cartucho 10 de detección bacteriana a través de la salida 42 de la presión. La salida 42, 43 de escape de la presión se mantiene abierta cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho es empujado hacia abajo en la primera y la segunda posiciones sobre la bandeja 18 del cartucho. Una vez en la segunda posición, la salida 42 de escape de la presión es vuelta a sellar. El bloque elevado 44 está alineado con las salidas 42, 43 de escape de la presión. El bloque elevado 44 impide que la muestra fluya al área ocupada por el bloque elevado. Si estuvieran la muestra 66, el gel de resina 34 y el sensor 36 en un compartimento 24 en lugar del bloque elevado 44, toda la muestra 66 en el compartimento 24 debajo de la salida 42, 43 de escape de la presión estaría expuesta a todo el espacio superior entre la porción 12 de la tapa superior y la porción 14 de la tapa inferior debido a la porción abierta 43. Este espacio superior podría obstaculizar la detección bacteriana, por lo que se prefiere el bloque elevado 44.

50 La bandeja 18 del cartucho contiene también un distribuidor 46 de muestras de entrada elevado. El distribuidor 46 de muestras de entrada elevado está en comunicación fluida con el puerto 20 de inyección de muestras. Cuando la muestra 66 es introducida por una jeringa u otro dispositivo, la muestra 66 fluye a través de la superficie del distribuidor 46 de muestras de entrada en todas las direcciones a la bandeja 18 del cartucho. Esto asegura una distribución de muestras más uniforme en el conjunto del cartucho cuando se llena con muestras.

55 Con referencia generalmente a las Figuras 11-18, se ilustran los pasos mediante los cuales el cartucho 10 de detección bacteriana de acuerdo con un aspecto de la descripción es ensamblado y llenado. El cartucho 10 de detección bacteriana se ilustra en unas vistas lateral y en perspectiva lateral en estas figuras. El primer paso es para cerrar por presión la porción 12 de la tapa superior en la porción 14 de la tapa inferior para formar el conjunto 16 de la tapa del cartucho. La bandeja 18 del cartucho está también preparada para insertar un gel de resina 34 en los recipientes 32 de la bandeja del cartucho y además depositar el revestimiento biosensor 36 sobre las superficies previamente descritas. Los pasos del ensamblaje pueden ser realizados por el fabricante, mejor que por el usuario final. En tales aspectos el usuario comienza con una tapa 16 del cartucho y la bandeja 18 del cartucho previamente

ensambladas. Se prefiere el ensamblaje por un fabricante ya que el cartucho 10 de detección bacteriana es preferiblemente esterilizado y en la primera posición cuando es proporcionado a un usuario. El usuario a continuación ensambla el cartucho 10 de detección bacteriana en su primera posición, como se muestra en la Figura 12, presionando hacia abajo el conjunto 16 de la tapa del cartucho parcialmente sobre la bandeja 18 del cartucho. Como se ha mencionado anteriormente, este paso es preferiblemente realizado por un fabricante de modo que los componentes estén esterilizados y en la primera posición cuando son proporcionados al usuario, aunque el conjunto del usuario esté todavía dentro del alcance de la exposición. El conjunto 16 de la tapa del cartucho y la bandeja 18 del cartucho incluye cada uno unos dispositivos para bloquearlos conjuntamente. El fallo en el bloqueo indica que el conjunto 16 de la tapa del cartucho y la bandeja 18 del cartucho no están en acoplamiento correcto. Los dispositivos de bloqueo pueden incluir varios dispositivos de bloqueo tales como salientes y los correspondientes entrantes, de modo que el conjunto 16 de la tapa del cartucho y la bandeja 18 del cartucho puedan bloquearse en varias etapas discretas. Los dispositivos de bloqueo pueden ser, por ejemplo, los dientes de sierra 47 en el conjunto 16 de la tapa del cartucho y las muescas 48 en la bandeja 18 del cartucho. Los dientes de sierra 47 y las muescas 48 están configurados en el aspecto ilustrado para permitir que el conjunto 16 de la tapa del cartucho se aplique y bloquee la bandeja 18 del cartucho en la primera y la segunda posición. Los dientes de sierra 47 inicialmente se cierran por presión en las muescas 48 en la primera posición, después de lo cual el conjunto 16 de la tapa del cartucho puede ser avanzado para cerrar a presión los dientes de sierra 47 en un conjunto adicional de muescas 48 para mover el cartucho 10 de detección bacteriana a la segunda posición.

La preparación de la muestra está ilustrada en la Figura 13. La muestra 66 puede ser recogida, por ejemplo, directamente del paciente en una jeringa 50 o un dispositivo similar llenado previamente con medios de crecimiento 56 y con un vacío parcial equilibrado con nitrógeno u otros compuestos de gas preferidos para estabilidad en el almacenamiento. En un aspecto la jeringa 50 puede contener aceite, descrito después con más detalle. Una aguja de mariposa 52 tradicional puede ser usada con un primer extremo situado en la fuente de la muestra en el paciente 54 (por ejemplo en una vena) y con un segundo extremo conectado a una aguja en la jeringa 50. Un émbolo 58 y una aguja 60 son a continuación conectados a la jeringa 50 para inyectar la muestra 66 en el cartucho 10 de detección bacteriana. El paso de recogida puede alternativamente incluir varios pasos, en los que la muestra es primero recogida del paciente, experimenta algún tipo de procesamiento previo, y después es introducida en el cartucho 10 de detección bacteriana por medio del tubo de recogida. La muestra 66 no está limitada a sangre, y puede también ser cualquier otra muestra biológica tal como fluido espinal, orina, saliva, etc.

Cuando el cartucho 10 de detección bacteriana está en la primera posición, la separación entre la porción 14 de la tapa inferior y la bandeja 18 del cartucho es tal que la muestra 66 fluirá a través de la bandeja 18 del cartucho y relativamente de una manera uniforme llenará una porción de cada compartimento 24 como está ilustrado en la Figura 15. La muestra 66 no fluirá a la zona ocupada por el bloque elevado 44. El usuario perfora el tabique 21 en el puerto 20 de inyección de muestras con la aguja 60 en la jeringa 50, y presiona el émbolo 58 para inyectar la muestra 66 en el cartucho 10 de detección bacteriana. Debido a que el cartucho 10 de detección bacteriana está en la primera posición, la muestra 66 puede fluir libremente a través de la parte inferior de la bandeja 18 del cartucho, con una distribución uniforme de la muestra ayudada por la guía de distribución 46 de entrada elevada de las muestras, como se muestra en la Figura 14. Durante la inyección de la muestra la cinta metálica resellable 45 en la salida 42 de escape de la presión está en la posición abierta, permitiendo que la presión dentro del cartucho 10 de detección bacteriana se iguale con la presión fuera del cartucho 10 de detección bacteriana. Una estación de acoplamiento 62 del cartucho y la jeringa puede opcionalmente ser empleada para proporcionar una estabilidad adicional al cartucho 10 de detección bacteriana y para proporcionar una guía para la jeringa 50. Se consideran unos sistemas robóticos automatizados para proporcionar la muestra a los compartimentos.

Después de que la muestra 66 haya sido totalmente inyectada y después de que el volumen de la muestra se haya equilibrado entre los compartimentos (una persona experta apreciaría que el aspecto de "autonivelación" de la distribución de la muestra dentro de la bandeja se consigue mejor cuando la bandeja está en una posición nivelada), el usuario avanza el conjunto 16 de la tapa del cartucho sobre la bandeja 18 del cartucho hasta que los dientes de sierra 47 se aplican en el siguiente conjunto de muescas 48, moviendo el cartucho 10 de detección bacteriana a la segunda posición, como se muestra en la Figura 15. Aunque no está específicamente descrito aquí, el conjunto es fácilmente configurado para proporcionar una o más posiciones intermedias.

Con referencia a las Figuras 16A-B, cuando el conjunto 16 de la tapa del cartucho es avanzado desde la primera posición a la segunda posición, las barras de sellado 30 avanzan más en las aberturas de ventilación 28 sellándolas. Antes de que las paredes 24a-d que salen hacia abajo del compartimento 24 entren en contacto con el sensor 36 dispuesto en la superficie de la bandeja 18 del cartucho, el aire 64 se escapa a través de la abertura de ventilación 28. Cuando las paredes 24a-d que salen hacia abajo del compartimento 24 avanzan sobre el sensor 36 en la bandeja 18 del cartucho las barras de sellado 30 simultáneamente se conectan con las aberturas de ventilación 28. Una vez que las paredes 24a-d que salen hacia abajo del compartimento 24 tocan la bandeja 18 del cartucho, la muestra 66 es sellada en varios compartimentos 24. La cinta metálica resellable 45 es a continuación vuelta a sellar para aislar del medio ambiente la muestra dentro del cartucho 10 de detección bacteriana. Si se desea, se pueden usar unas juntas de estanquidad en forma de cintas para sellar entre el conjunto 16 de la tapa del cartucho y la bandeja 18 del cartucho para impedir posibles fugas.

Una vez que la muestra 66 es cargada en el cartucho 10 de detección bacteriana y sellada, el cartucho es colocado en una incubadora 70 para que los microorganismos crezcan en la muestra. El sensor 36 detecta el crecimiento, por ejemplo detectando cambios en la concentración de O₂ y/o CO₂ a partir de los niveles aumentados de metabolismo bacteriano, e informa de cada compartimento 24 que da positivo para el crecimiento. Como tales técnicas de detección son bien conocidas en la técnica, no se describen aquí con más detalle. Se pueden usar mecanismos de ultrasonidos o similares para agitar el cartucho 10 de detección bacteriana durante la inoculación.

Como se muestra en el aspecto ilustrado en la Figura 18, los compartimentos 24 del cartucho 10 de detección bacteriana están dispuestos en un formato de rejilla, incluyendo cada compartimento unos identificadores. Por ejemplo, los compartimentos pueden incluir una letra identificadora de la fila y un número identificador de la columna (G3, G4, H3, H4, etc). Se informa al usuario de cada compartimento 24 que da positivo para el crecimiento bacteriano por la incubadora 70. Si cualquier compartimento 24 muestra señales de crecimiento bacteriano, hay a menudo la necesidad de retirar la muestra 66 de esos compartimentos 24 para procedimientos de procesamiento posterior tales como la identificación o ensayo de susceptibilidad a antibióticos. El usuario identifica el o los comportamientos específicos 24 que dan positivo para el crecimiento bacteriano, inserta un dispositivo de retirada tal como una jeringa o una pipeta en el compartimento deseado a través de las aberturas de acceso 22, 26 de la tapa superior e inferior respectivamente, perfora cualquier cinta metálica o película 72 que cubre las aberturas, y retira la muestra positiva 66. A continuación el usuario puede realizar el procesamiento posterior deseado de la muestra positiva para, por ejemplo, identificar las bacterias en la muestra de sangre 66. Uno, varios, o todos los pasos antes mencionados pueden ser automatizados. El cartucho 10 de detección bacteriana no está limitado a un plato redondo sino que puede tener otras formas que incluyen, pero no están limitadas a, la oval u otras poligonales.

En las Figuras 19-20 se muestra un aspecto alternativo del cartucho 10 de detección bacteriana. En este aspecto, la porción 12 de la tapa superior y la bandeja 18 del cartucho son sustancialmente similares a los aspectos previamente descritos. La parte superior de la porción 14 de la tapa inferior en el aspecto ilustrado está desviada hacia abajo hacia el centro de cada compartimento 24. Esta desviación hacia abajo 74 proporciona un mecanismo de guía para la inserción de un dispositivo de acceso tal como una jeringa o una pipeta. La desviación hacia abajo 74 proporciona además una barrera para que la muestra 66 escape si ocurre un salpicado durante la manipulación del cartucho 10 de detección bacteriana. Adicionalmente, si una porción de la muestra 66 se pega a la superficie superior de la porción 14 de la tapa inferior, por ejemplo mientras se transporta el cartucho 10 de detección bacteriana, la desviación hacia abajo 74 proporciona un camino para que la muestra fluya hacia abajo al compartimento 24. Esto puede ser especialmente útil considerando los pequeños volúmenes de la muestra 66 en cada compartimento 24.

La Figura 20 muestra otro aspecto de la descripción. La jeringa 50 (Figura 13) está empaquetada previamente con aceite, por ejemplo aceite mineral, además de los medios de crecimiento 56. La muestra 66 con los medios de crecimiento 56 y el aceite es cargada en el cartucho 10 de detección bacteriana como antes descrito. Una vez cargada, la baja densidad y la baja miscibilidad del aceite hacen que el aceite migre a la superficie superior de la muestra 66 creando una capa de aceite 76. Se pueden usar otros fluidos además del aceite mineral que incluyen, pero no están limitados a, aceite de silicona y polímeros orgánicos. La capa de aceite 76 actúa como un elemento estanco para aislar la muestra 66 del medio ambiente exterior con la capa de aceite 76. Este sellado fluido puede ser usado alternativamente, o en adición a, materiales sellables tales como las cintas metálicas adhesivas antes descritas.

La operación del cartucho 10 de detección bacteriana con dos etapas de empujado a una primera y una segunda posición puede ser funcionalmente sustituida por unos mecanismos alternativos. Por ejemplo, puede usarse con un resultado similar un mecanismo de giro hacia abajo, o un mecanismo de deslizamiento, como se muestra en las Figuras 21A-B y 22A-B. Con referencia a la Figura 21A, se muestra una vista desde arriba del cartucho 10 de detección bacteriana. La bandeja 18 del cartucho incluye unos recipientes 32 antes descritos y adicionalmente incluye los puntales 80. La porción 14 de la tapa superior en el aspecto ilustrado tiene unas paredes 82 que salen hacia abajo. El conjunto 16 de la tapa del cartucho está situado sobre la bandeja 18 del cartucho en una primera posición mostrada en la Figura 21A, en la que las paredes 82 y los puntales 80 no forman un compartimento 24 completamente aislado. Esto es funcionalmente similar a la primera posición antes descrita, en la que la muestra 66 puede ser introducida en el cartucho 10 de detección bacteriana y fluir uniformemente a través de él. Una vez que la muestra 66 ha sido introducida, el conjunto 16 de la tapa del cartucho puede ser trasladada a una segunda posición ilustrada en la Figura 21B. En la segunda posición las paredes 82 y los puntales 18 están colocados para aislar cada compartimento 24, incluyendo la muestra 66 en él. Las formas específicas de los componentes descritos pueden variar, basándose en elecciones de diseño, mientras que consigan un resultado similar. Por ejemplo, las Figuras 22A-B muestran además otro aspecto del mecanismo de deslizamiento, excepto que los puntales 80a son salientes rectangulares en vez de salientes triangulares como en las Figuras 21A-B. Las paredes 82a mostradas en las Figuras 22A-B tienen una forma que se corresponde con los salientes 80a de modo que el conjunto 16 de la tapa del cartucho pueda deslizarse desde la primera posición (Figura 22A) en la cual la muestra 66 puede fluir libremente a una segunda posición (Figura 22B) en la que los compartimentos 24 aíslan la muestra.

Un posterior aspecto del cartucho 100 de detección bacteriana (que no es parte de la invención) está ilustrado en la Figura 23. En este aspecto el cartucho 100 de detección bacteriana es un disco circular con una pluralidad de paredes 101 que se extienden radialmente. Una pluralidad de compartimentos 124 están creados por las paredes

101 en combinación con el cartucho 100 de detección bacteriana, estando cada compartimento definido por dos paredes contiguas 101 y las paredes superior, inferior y lateral del cartucho de detección bacteriana. La Figura 23 ilustra un aspecto de los 32 compartimentos, con la mitad de los compartimentos omitidos por claridad de la ilustración. La pared superior de cada compartimento 124 incluye una abertura de ventilación 128 que proporciona un mecanismo de ventilación que se discute más adelante. Las aberturas de ventilación 128 pueden actuar adicionalmente como aberturas de acceso para una pipeta u otra herramienta de retirada para retirar la muestra 166 del correspondiente compartimento 124. Alternativamente, cada compartimento 124 puede incluir una abertura de acceso independiente (no ilustrada) además de las aberturas de ventilación 128.

Como está ilustrado en la Figura 24, cada compartimento 124 es cargado previamente con un revestimiento biosensor 136 sobre la superficie inferior. El revestimiento biosensor 136 puede ser dispuesto según un patrón anular sobre la superficie inferior del cartucho 100 de detección bacteriana, o en otras configuraciones. Aunque se prefiere un revestimiento biosensor 136 para el sensor, se pueden usar otros sensores conocidos en la técnica. Cada compartimento incluye además un recipiente 132 configurado para recibir reactivos tales como pastillas 134 de gel de resina. En un aspecto, el recipiente es un borde elevado sobre la superficie inferior del cartucho 100 de detección bacteriana. En otros aspectos las pastillas 134 de gel de resina pueden ser aplicadas directamente a la superficie inferior del cartucho de detección bacteriana sin el uso de los recipientes 132.

Un émbolo 190 está dispuesto cerca del centro del cartucho de detección bacteriana encima de un distribuidor 146 de muestras de entrada elevado. El émbolo 190 tiene una primera posición abierta, como está ilustrado en la Figura 24. En la primera posición, el espacio entre el émbolo 190 y el distribuidor 146 de muestras de entrada elevado crea un canal de flujo 192. A medida que la muestra 166 es introducida en el cartucho 100 de detección bacteriana cuando el émbolo 190 está en la primera posición, la muestra fluye a través del canal de flujo 192 a los compartimentos 124. El émbolo 190 incluye un tabique 121 para facilitar la introducción de la muestra 166.

La preparación de la muestra es similar a la discutida con referencia a la Figura 13. Una vez que la muestra 166 está preparada, es inyectada, por ejemplo usando la jeringa 150, a través del tabique 121, fluye a través del canal de flujo 192 y llena los compartimentos 124, como está ilustrado en las Figuras 25A-B. Durante la introducción de la muestra las aberturas de ventilación 128 están abiertas para permitir la igualación de la presión. Una vez que la muestra 166 ha sido introducida, como está ilustrado en la Figura 25B, el émbolo 190 es movido a la segunda posición cerrada, como está ilustrado en las Figuras 26A-B. El usuario presiona el émbolo 190 en la dirección D para cerrar el émbolo en la segunda posición. El cartucho 100 de detección bacteriana incluye unos bloqueos por presión 198 para bloquear el émbolo 190 en la segunda posición. El cartucho 100 de detección bacteriana incluye una o más aberturas 194 situadas encima del émbolo 190. Estas aberturas 194 facilitan la igualación de la presión para facilitar la transición del émbolo 190 de la primera posición a la segunda posición. Una vez que el émbolo 190 está en la segunda posición, el canal de flujo 192 es sellado, y cada compartimento 124 con la muestra 166 es sellado al medio ambiente con la excepción de las aberturas de ventilación 128. Después de que el émbolo 190 ha sido movido a la segunda posición, las aberturas de ventilación 128 pueden ser selladas, por ejemplo con una cinta metálica 145 resellable. Similarmente, el tabique 121 puede ser sellado con, por ejemplo, una cinta metálica 196 resellable. Una vez que la muestra 166 ha sido totalmente introducida, el émbolo 190 es movido a la segunda posición, y las aberturas de ventilación 128 selladas, el cartucho 100 de detección bacteriana puede ser colocado en una incubadora. El crecimiento de organismos dentro del cartucho 100 de detección bacteriana, así como la detección, retirada, y procesamiento es sustancialmente similar a los procedimientos descritos anteriormente con otros aspectos. La forma del cartucho 100 de detección bacteriana permite que varios cartuchos sean apilados como se muestra en la Figura 27, para un almacenaje y transporte más fáciles.

Aunque la presente descripción ha sido realizada con referencia a aspectos particulares, se ha de entender que estos aspectos son meramente ilustrativos de los principios y aplicaciones de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra, comprendiendo el aparato:
una tapa del contenedor que tiene una pluralidad de grupos de paredes que salen hacia abajo;
5 una bandeja del contenedor adaptada para recibir una muestra y para ser ensamblada con la tapa del contenedor en una primera posición y en una segunda posición; y
una pluralidad de barras que salen hacia arriba desde la bandeja del cartucho y una pluralidad de aberturas de ventilación formadas en la tapa del contenedor, en donde las aberturas de ventilación están adaptadas para recibir las respectivas barras, y permitir que las barras avancen en las aberturas de ventilación, estando las barras dimensionadas para sellar las respectivas aberturas de ventilación cuando están
10 totalmente avanzadas en ellas;
en donde cuando están en la primera posición, los compartimentos definidos por los grupos de paredes que salen hacia abajo en la tapa del contenedor están abiertos entre sí para de este modo permitir que la muestra fluya de compartimento en compartimento dentro de la bandeja del contenedor;
en donde, cuando están en la segunda posición, los compartimentos están sellados unos de otros, estando
15 cada porción de la muestra confinada en su respectivo compartimento, estando cada compartimento definido por un grupo de paredes que salen hacia abajo, la tapa desde la cual se extienden las paredes que salen hacia abajo, y la bandeja del cartucho.
2. El aparato de la reivindicación 1, en donde al menos un compartimento incluye un sensor configurado para detectar al menos uno de la presencia, ausencia o crecimiento de un microorganismo en donde el sensor es
20 opcionalmente un revestimiento biosensor aplicado a la bandeja del contenedor.
3. El aparato de la reivindicación 1, en donde al menos un compartimento incluye un recipiente que sale hacia arriba desde una superficie de la bandeja del contenedor en donde el recipiente del al menos un compartimento está
opcionalmente lleno parcialmente con un gel de resina.
4. El aparato de la reivindicación 1, en donde la tapa del contenedor comprende unos salientes que tienen una
25 superficie irregular configurada para conformarse con una superficie irregular sobre las paredes laterales de la bandeja del cartucho, permitiendo las correspondientes irregularidades que la tapa del contenedor bloquee la bandeja del cartucho en una primera configuración de bloqueo y que sea avanzada para bloquear la bandeja del cartucho en una segunda configuración de bloqueo en donde la superficie irregular de la tapa es opcionalmente una pluralidad de dientes de sierra y la superficie irregular de la bandeja del cartucho es una pluralidad de muescas.
5. El aparato de la reivindicación 1, en donde las barras son totalmente avanzadas en las aberturas de ventilación cuando la tapa del contenedor avanza desde una primera configuración bloqueada a una segunda configuración bloqueada.
30
6. El aparato de la reivindicación 1, que además comprende un respiradero de presión formado en la tapa del contenedor y un bloque elevado formado en la bandeja del contenedor, estando alineado el respiradero de presión con el bloque elevado, de modo que, cuando la bandeja del contenedor está ensamblada con la tapa del contenedor en la segunda posición, el bloque elevado cierra la abertura de ventilación y además opcionalmente comprende una cinta metálica resellable que cubre el respiradero de presión.
35
7. El aparato de la reivindicación 1, en donde la tapa del contenedor comprende una pluralidad de aberturas de acceso, estando al menos una de las aberturas alineada con un compartimento respectivo, estando la al menos una abertura de acceso adaptada para recibir un dispositivo de acceso a través de ella para retirar la muestra del compartimento respectivo.
40
8. Un método para determinar la presencia de un microorganismo en una muestra, comprendiendo el método los pasos de:
proveer a una tapa del contenedor de una pluralidad de grupos de paredes que salen hacia abajo;
45 proveer una bandeja del contenedor de uno o más sensores, estando la bandeja del contenedor adaptada para ser ensamblada con la tapa del contenedor de modo que las paredes que salen hacia abajo definan una pluralidad de compartimentos en la bandeja del contenedor, y al menos uno de cada uno de los uno o más sensores esté dispuesto en cada una de al menos una porción de la pluralidad de compartimentos y en donde, en la primera posición, los compartimentos definidos por las paredes que salen hacia abajo estén abiertos entre sí;
50 ensamblar la tapa del contenedor en la bandeja del contenedor en una primera posición;
introducir una muestra en el conjunto;

- 5 mover el conjunto desde una primera posición a una segunda posición, en donde en la segunda posición los compartimentos están cerrados entre sí y las porciones de la muestra en cada compartimento están aisladas entre sí, en donde el paso de mover el conjunto de la primera posición a la segunda posición comprende avanzar al menos una barra que sale hacia arriba desde la bandeja del contenedor en aplicación sellada con una correspondiente abertura de ventilación en la tapa del contenedor; e
- interrogar al sensor para determinar al menos una de la presencia o la ausencia de un microorganismo en la muestra o, si un microorganismo está presente, su respuesta a un estado o a un reactivo al que la muestra esté sometida.
- 10 9. El método de la reivindicación 8, en donde el paso de ensamblar la tapa del contenedor a la bandeja del contenedor en la primera posición comprende además conformar los salientes de la tapa del contenedor que tienen una superficie irregular a una superficie irregular en las paredes laterales de la bandeja del cartucho, de modo que la tapa del contenedor se bloquee en la bandeja del cartucho en una primera configuración de bloqueo.
- 15 10. El método de la reivindicación 9, en donde el paso de mover el conjunto desde la primera posición a la segunda posición comprende además avanzar los salientes de la tapa del contenedor para conformarse con la superficie irregular en las paredes laterales de la bandeja del cartucho en una segunda configuración de bloqueo.

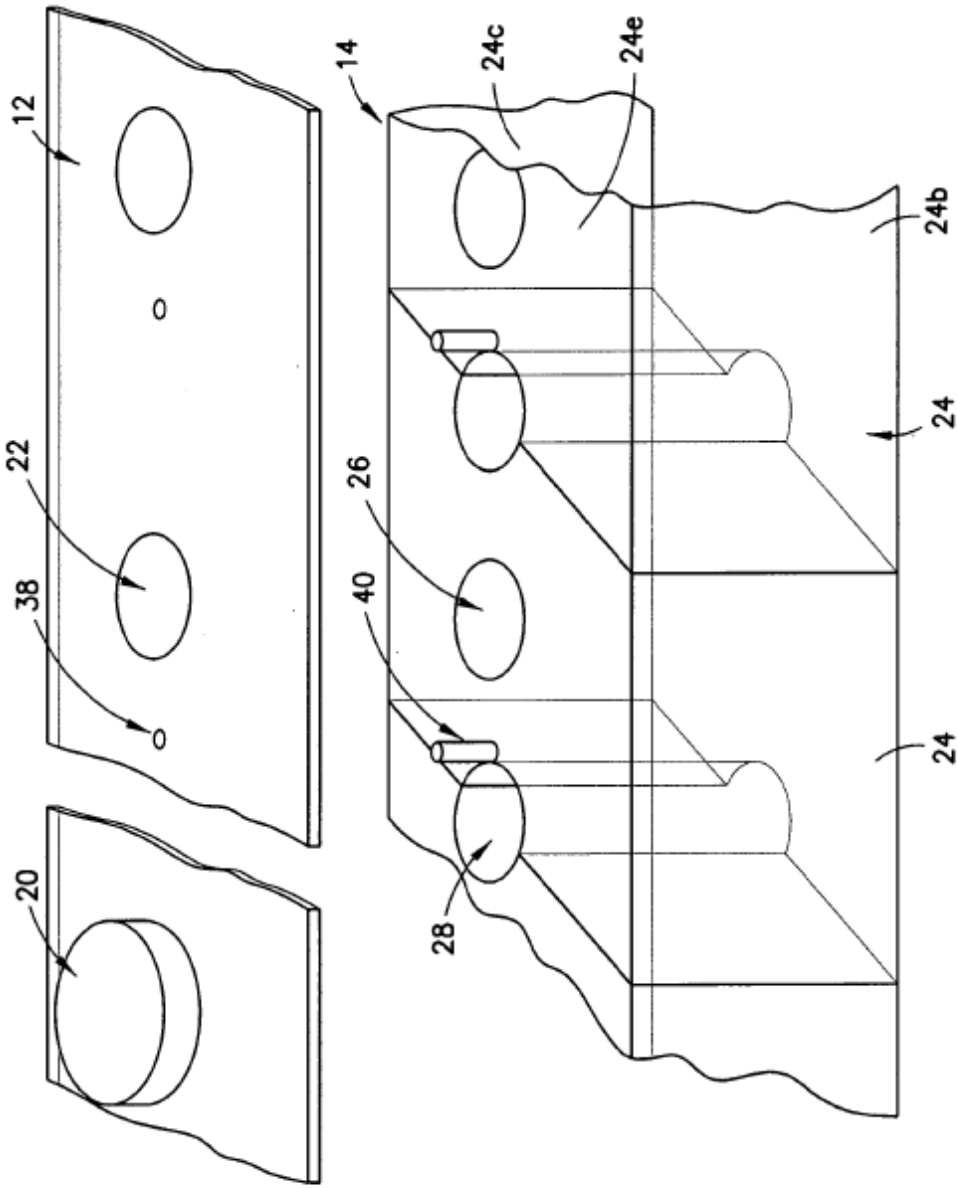


FIG.1

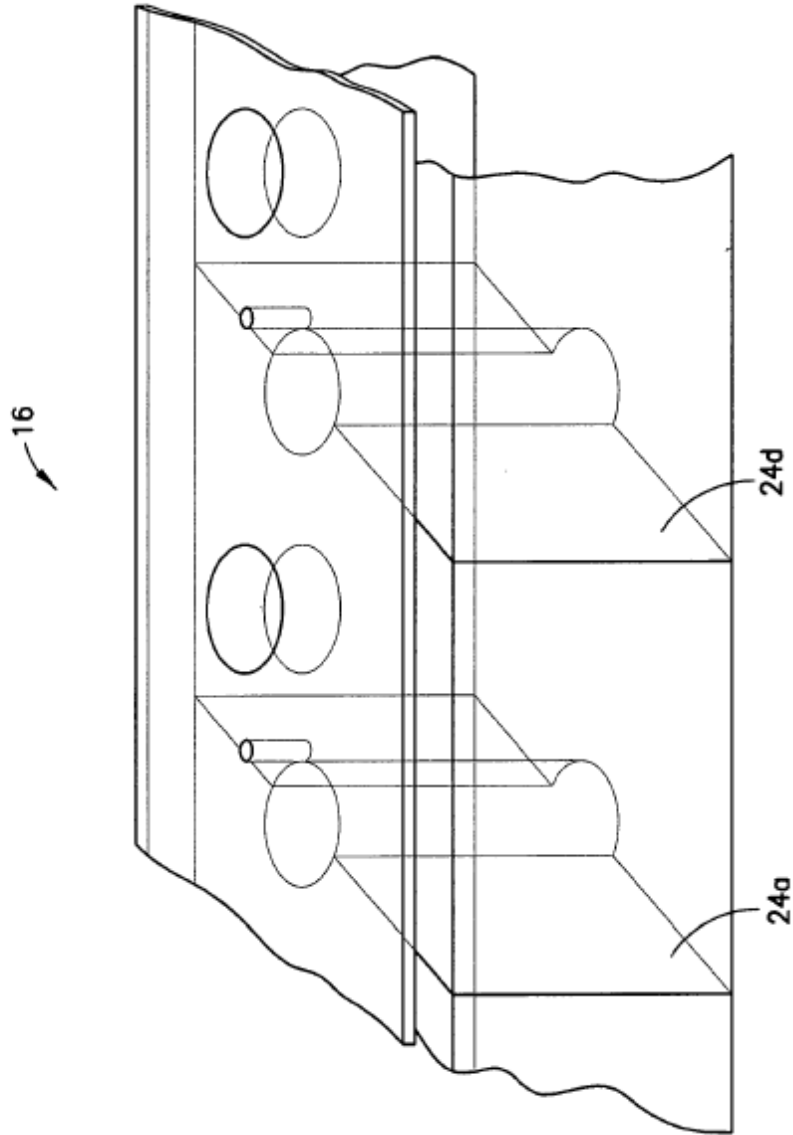
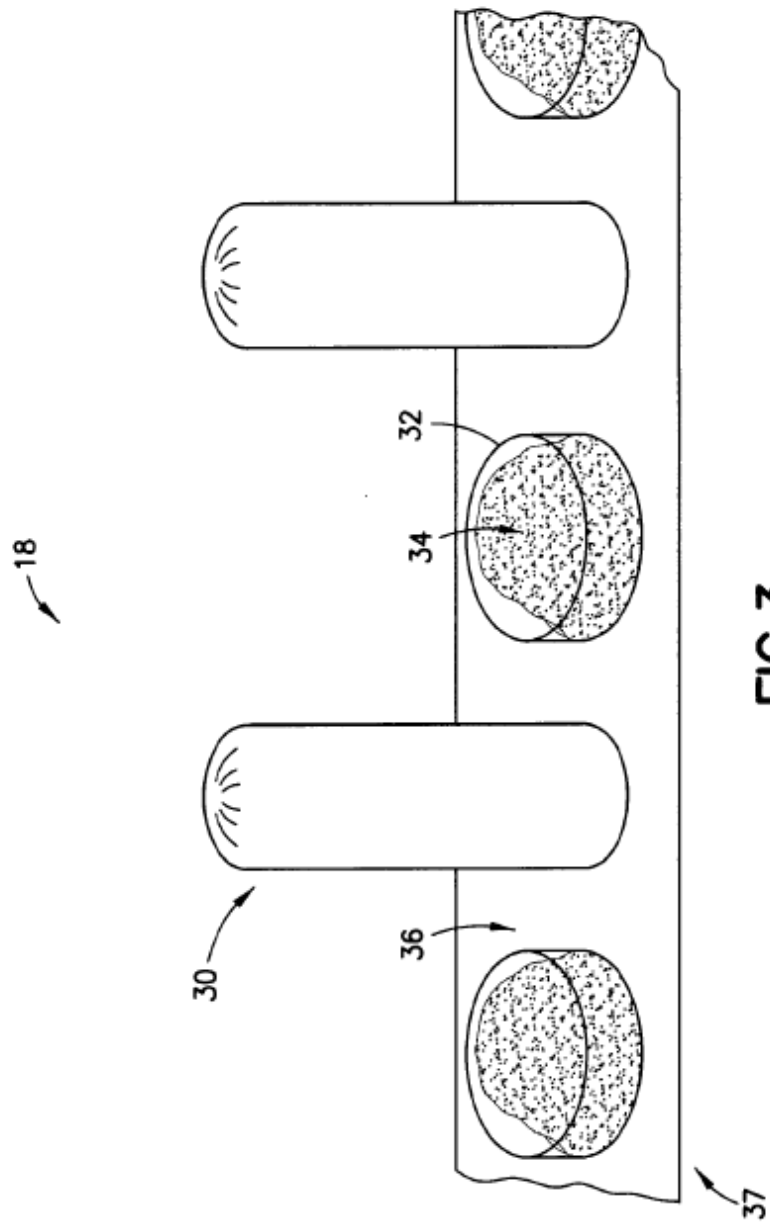


FIG.2



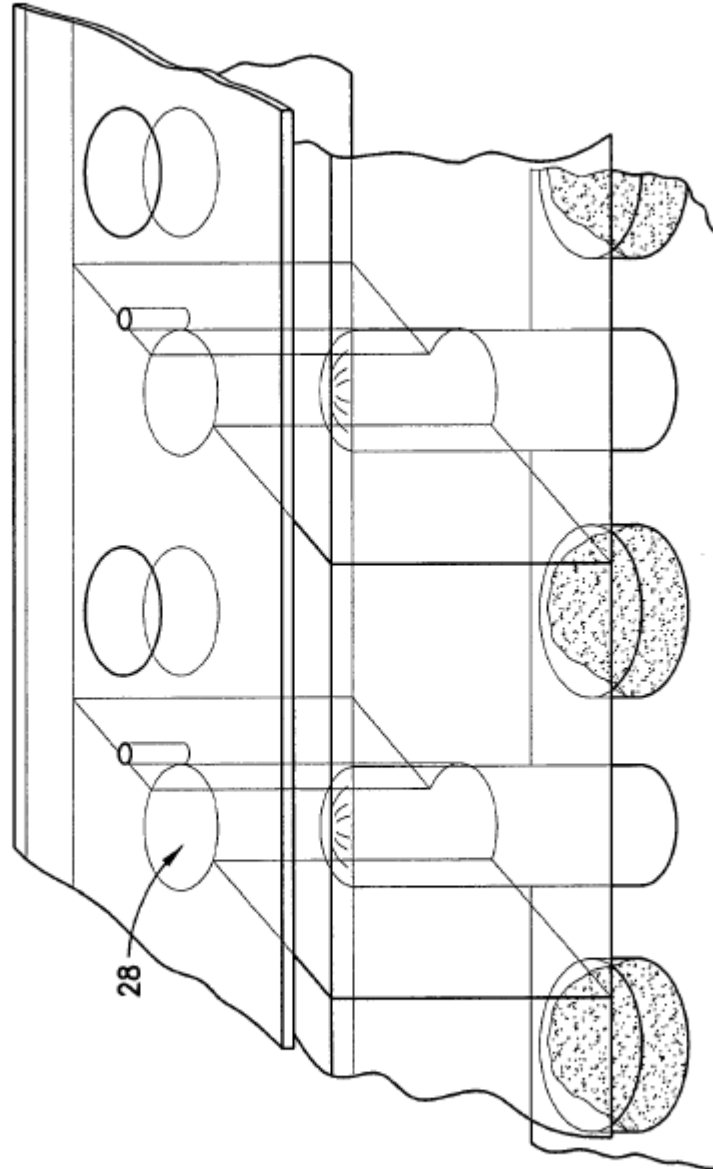


FIG.4

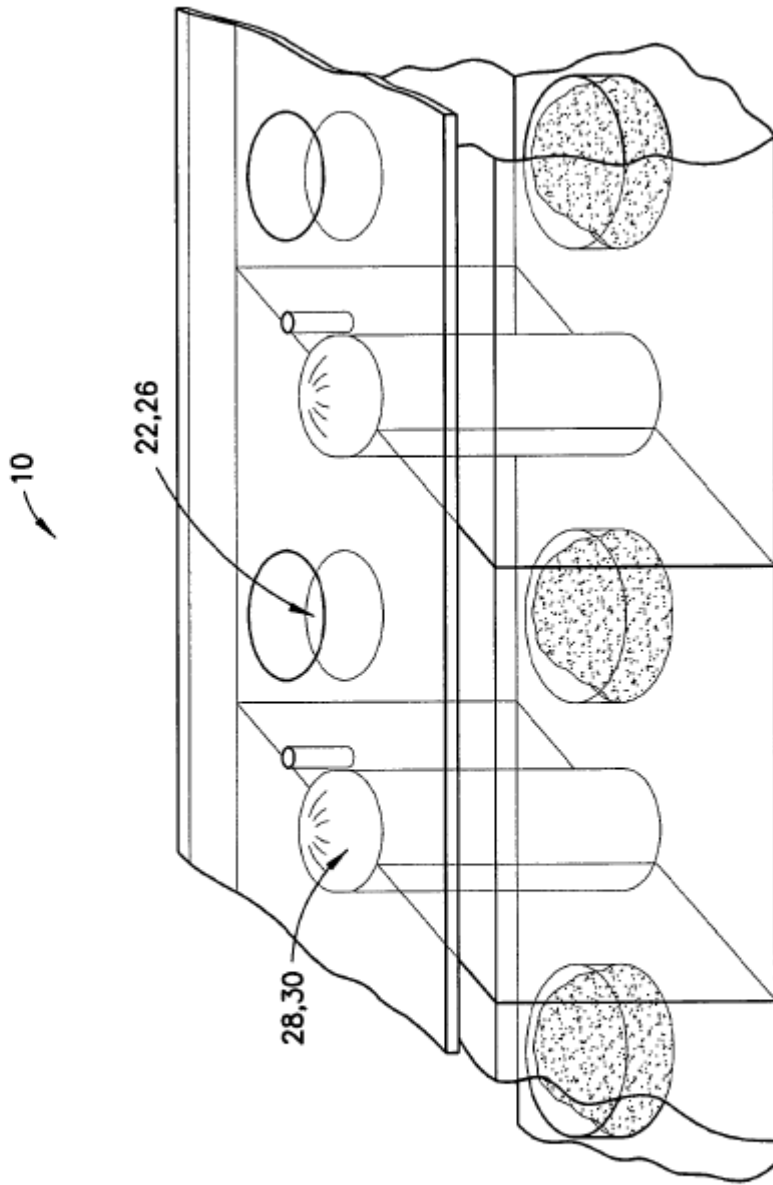


FIG.5

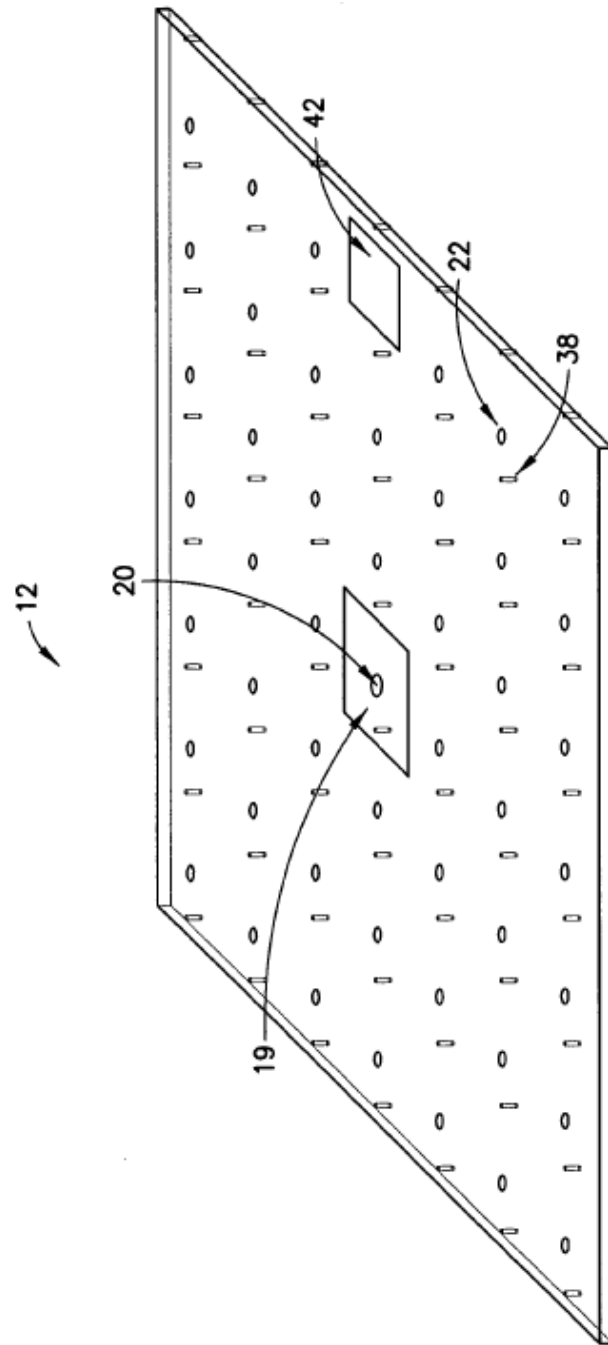


FIG. 6

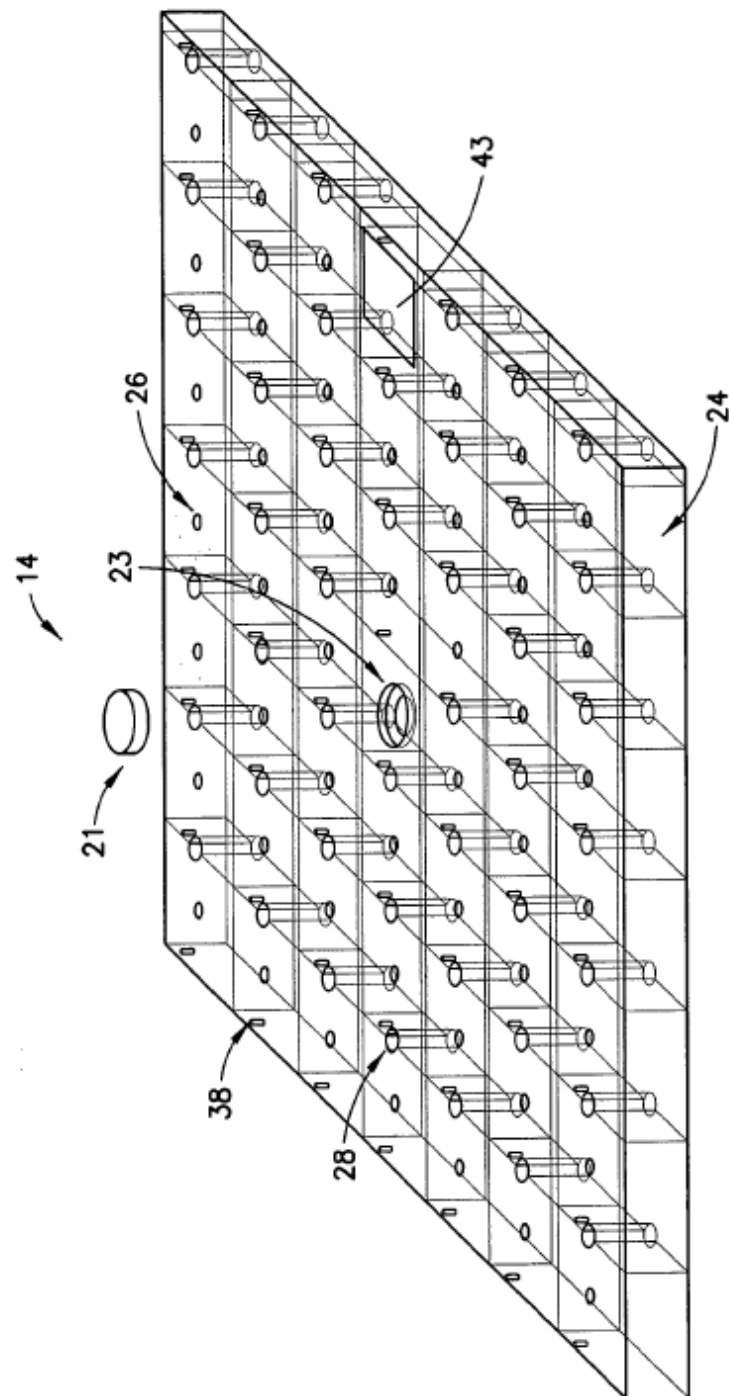


FIG.7

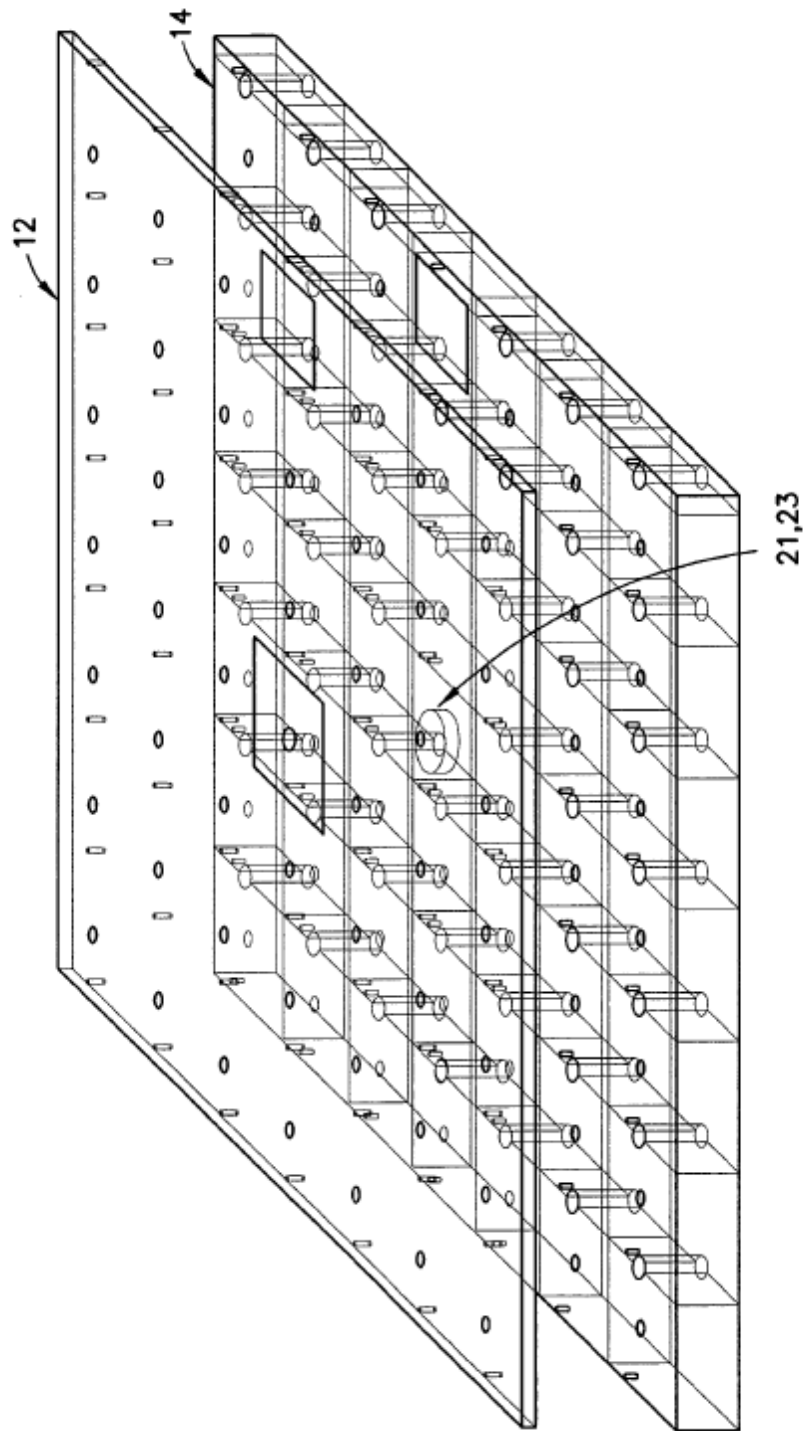


FIG.8

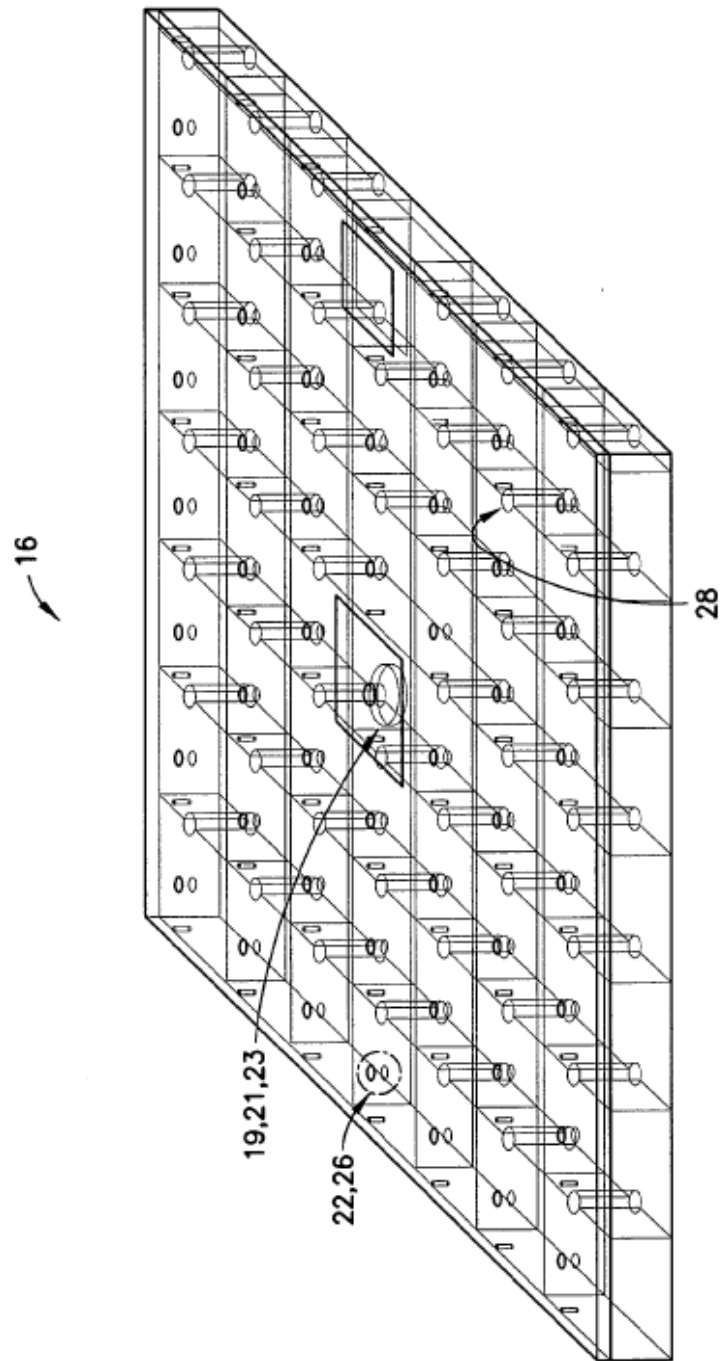


FIG.9

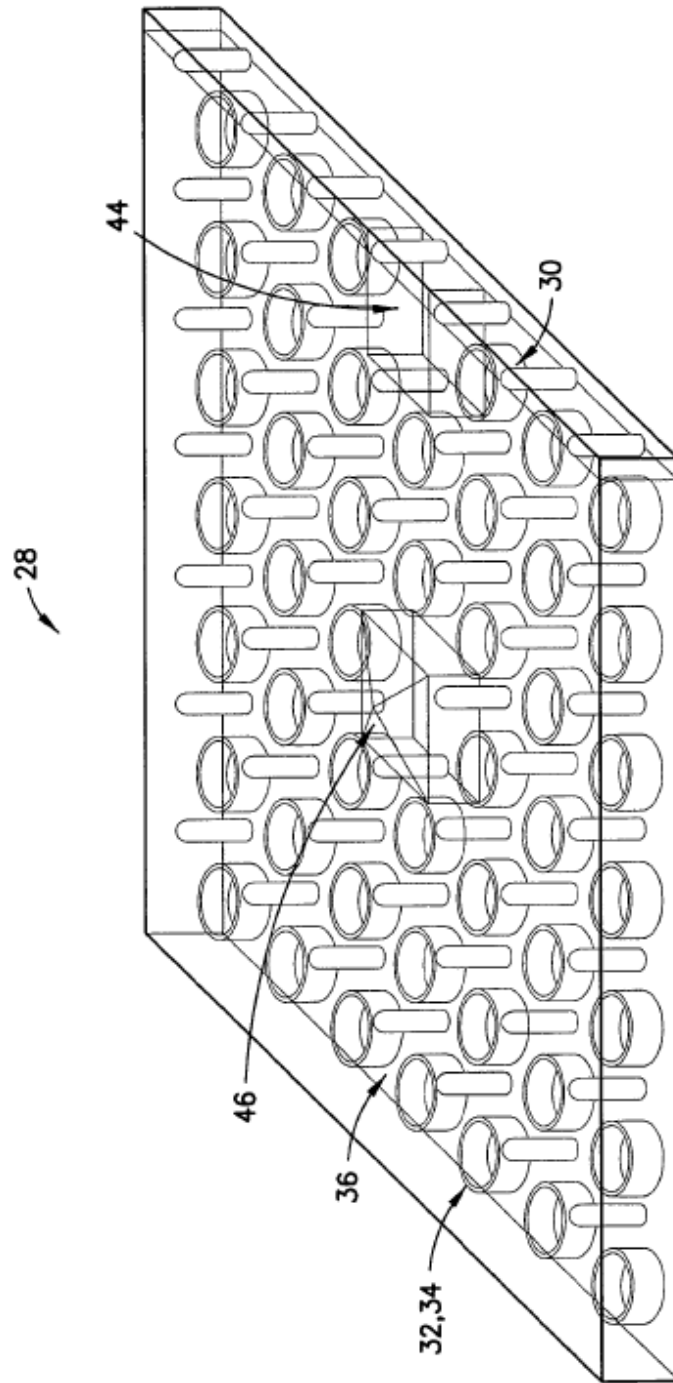


FIG. 10

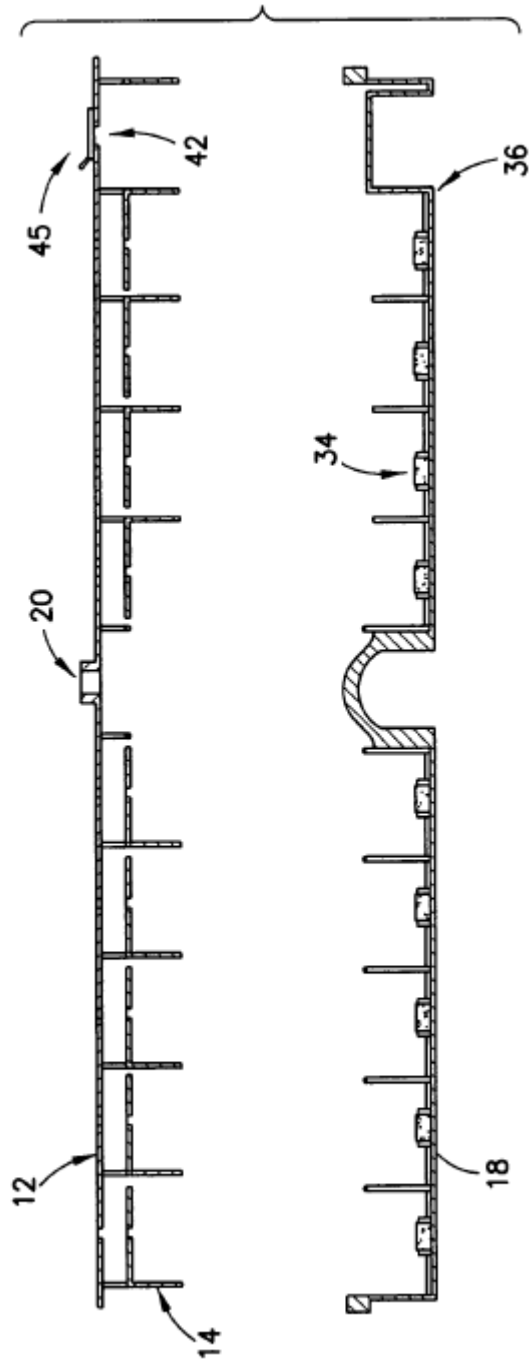


FIG.11

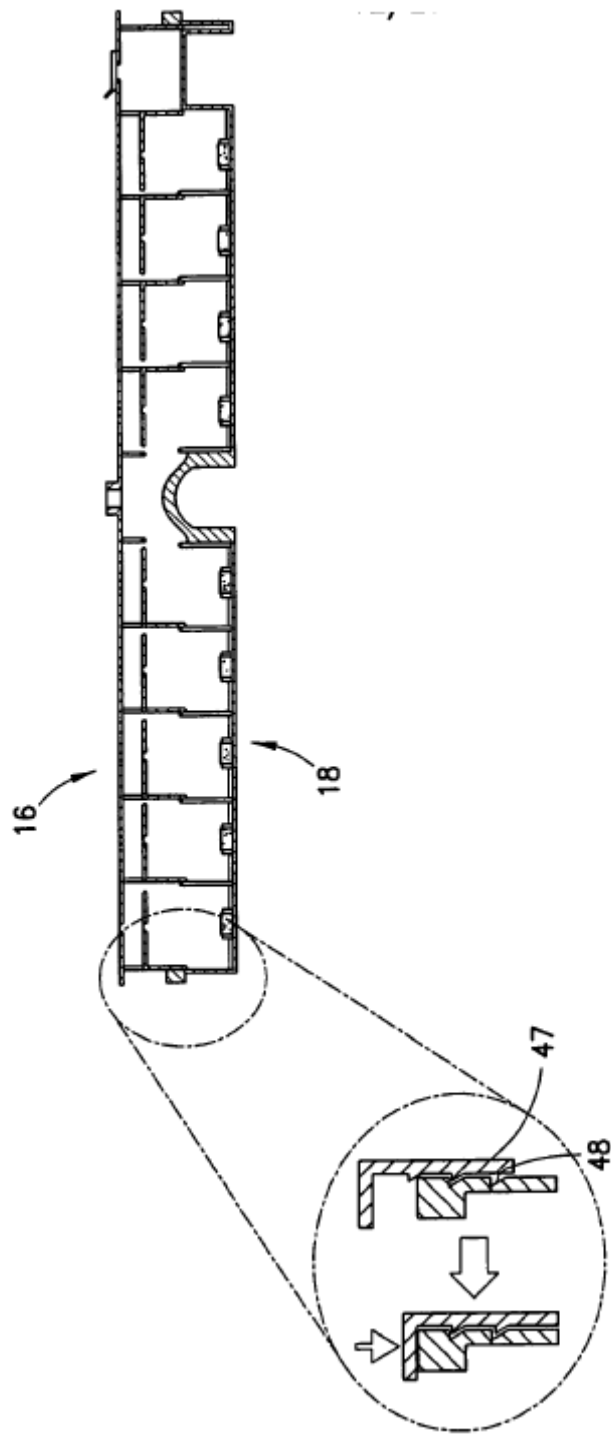


FIG.12

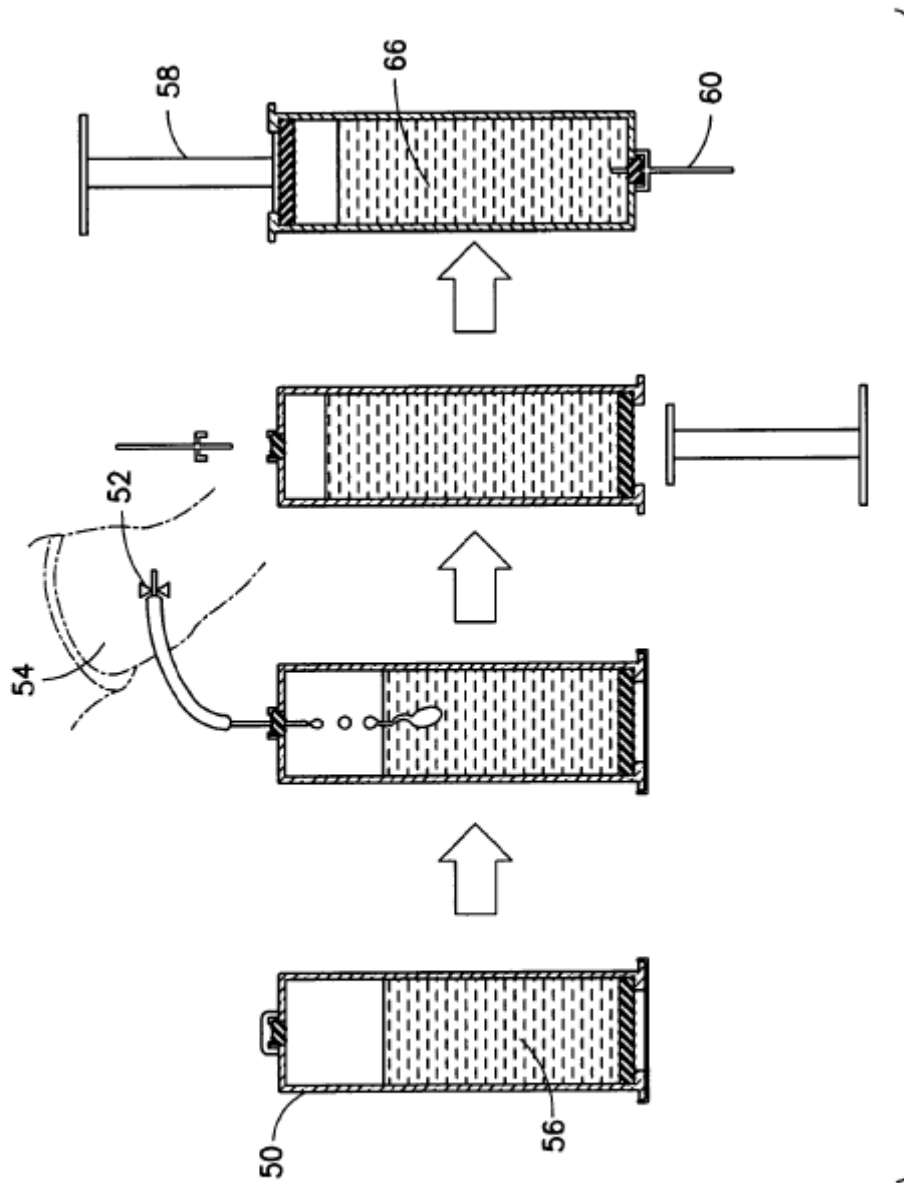


FIG.13

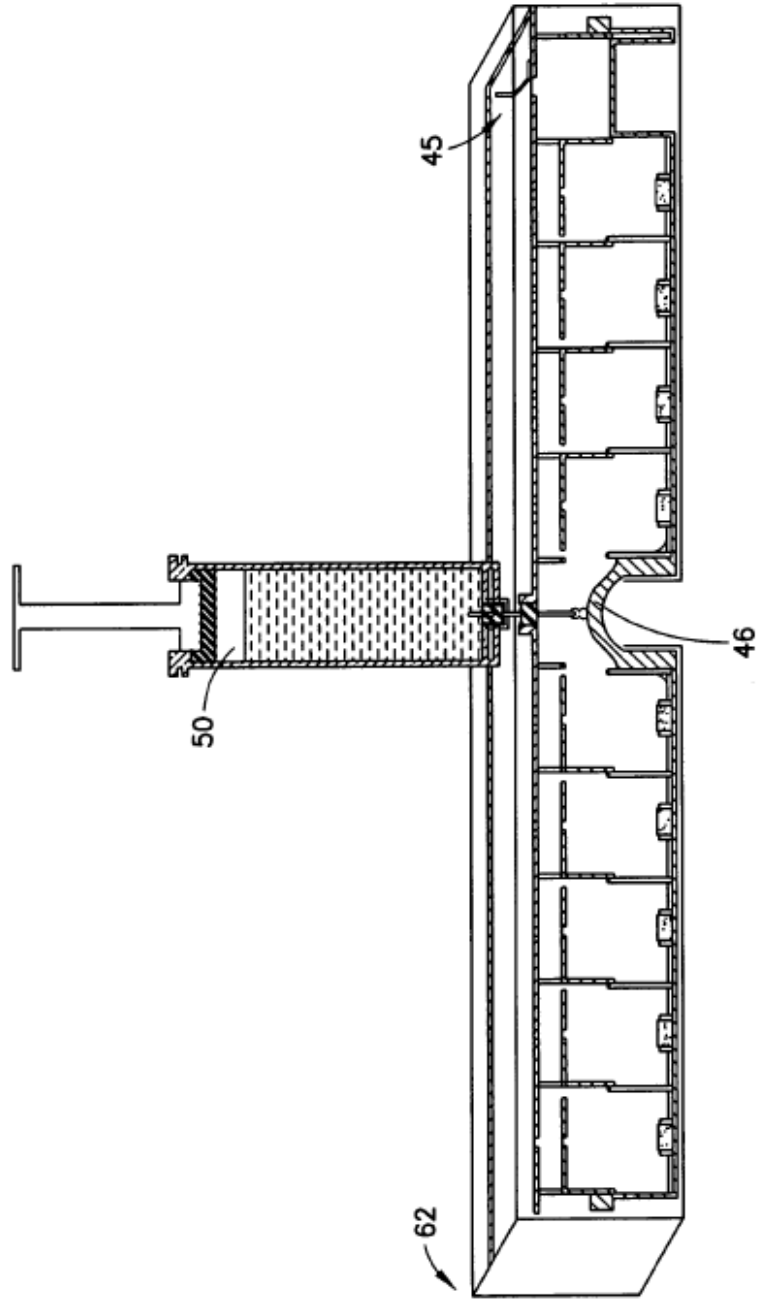


FIG.14

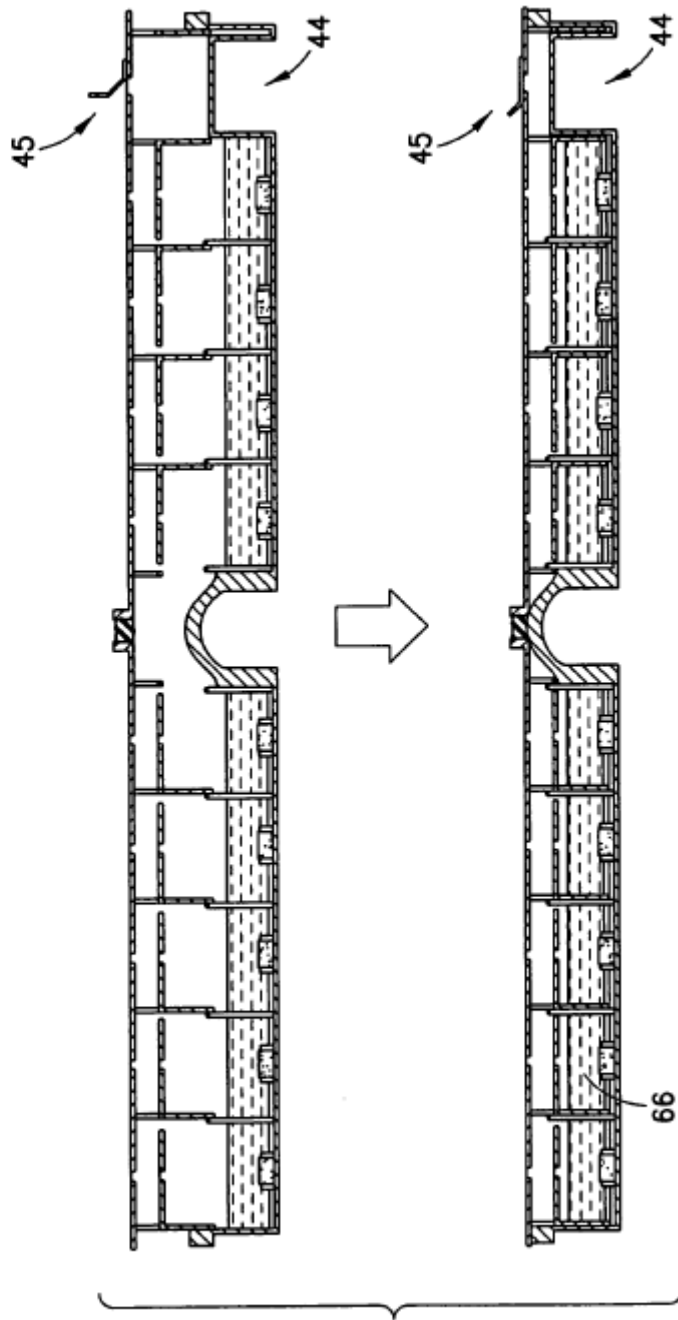


FIG.15

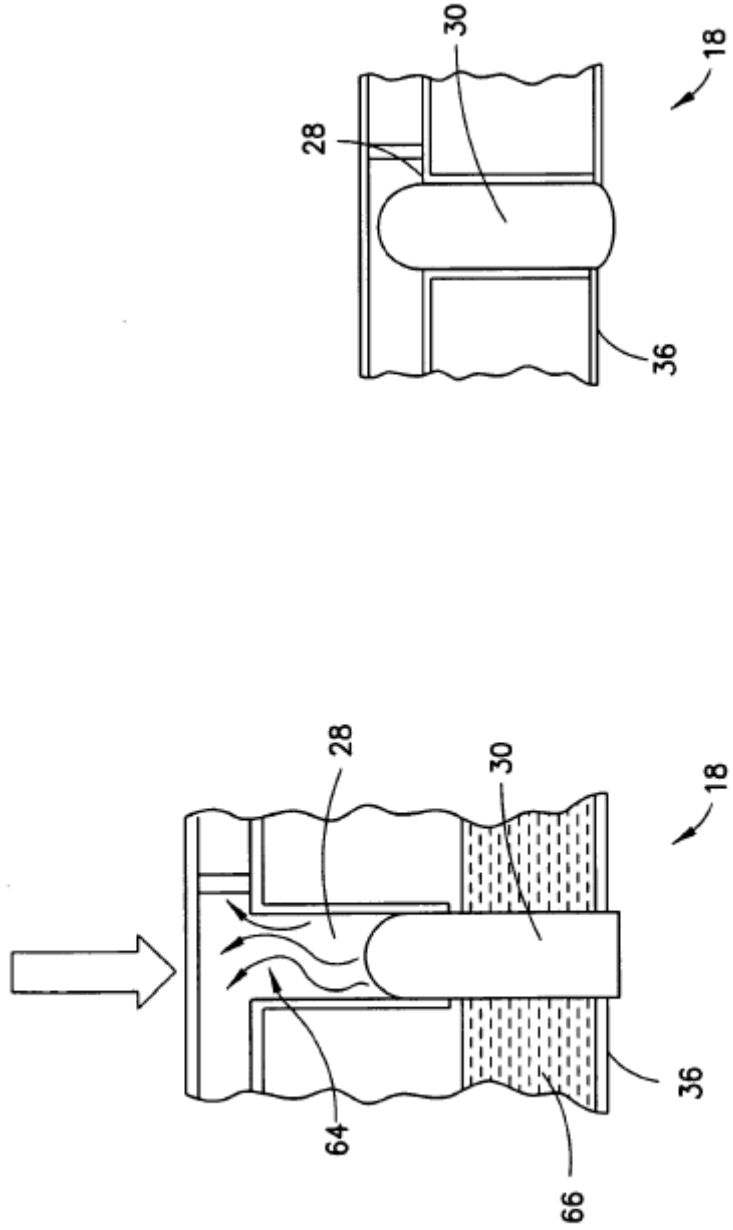


FIG. 16B

FIG. 16A

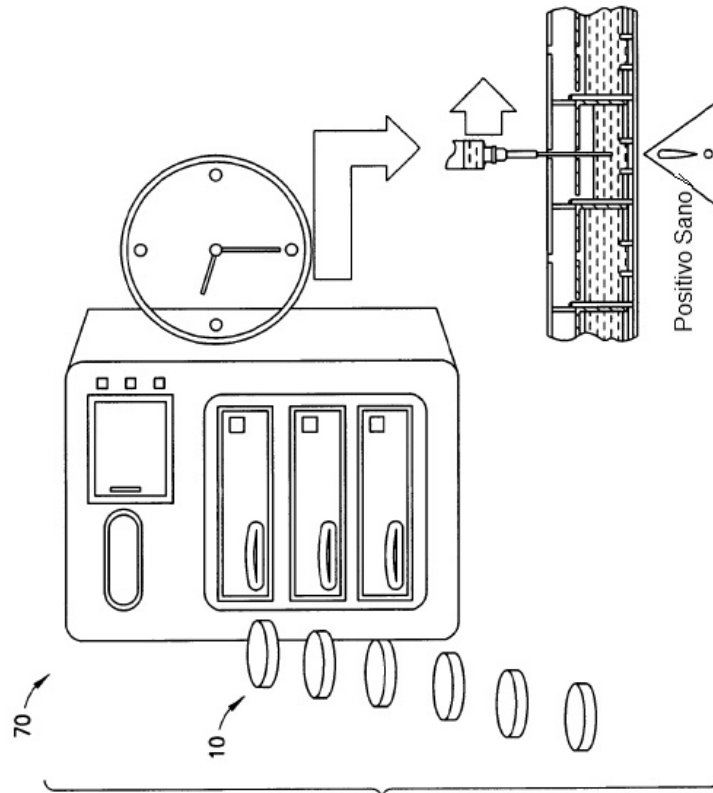


FIG.17

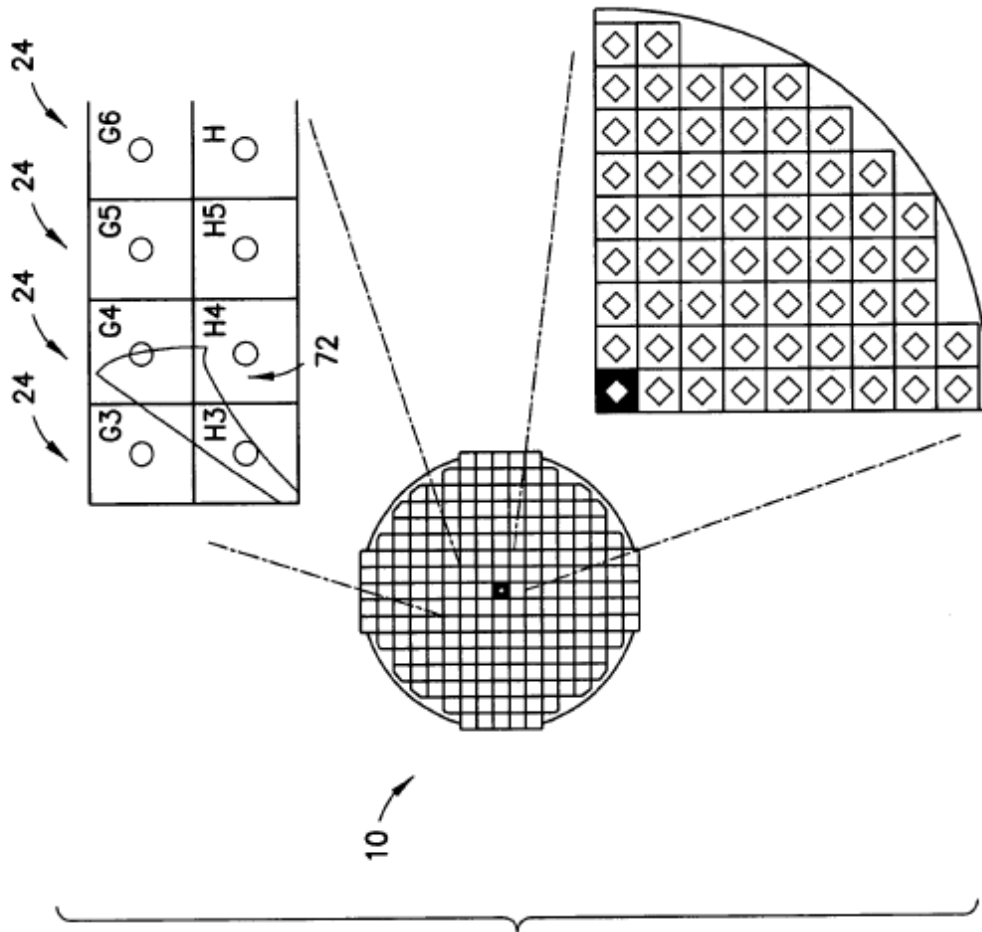


FIG. 18

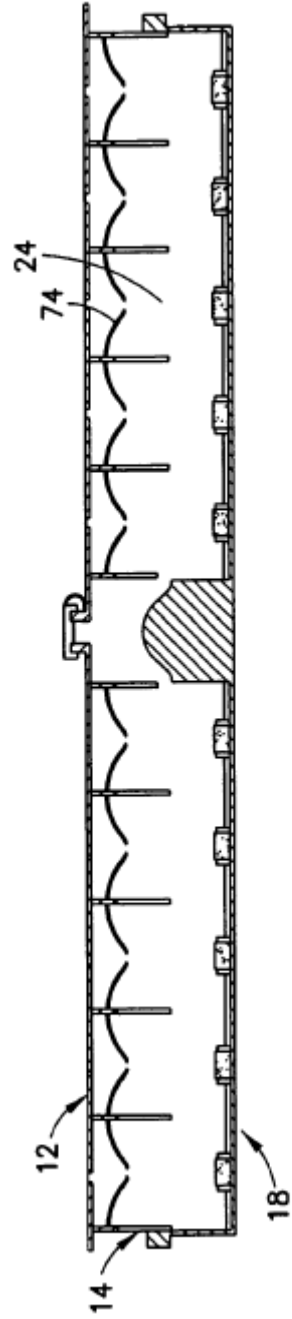


FIG.19

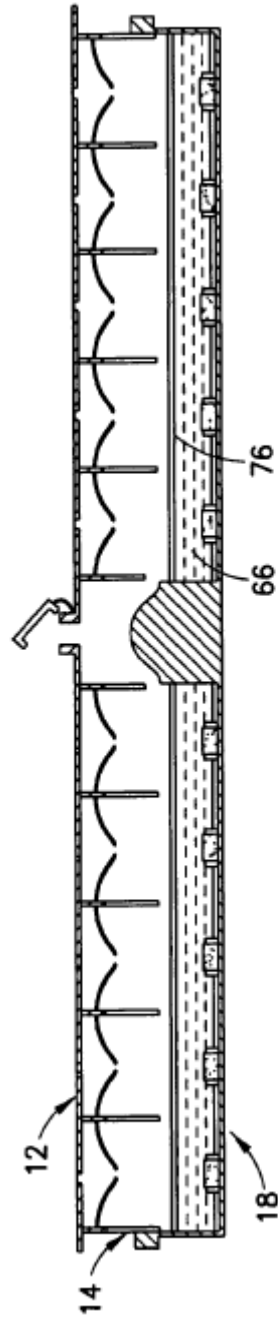


FIG.20

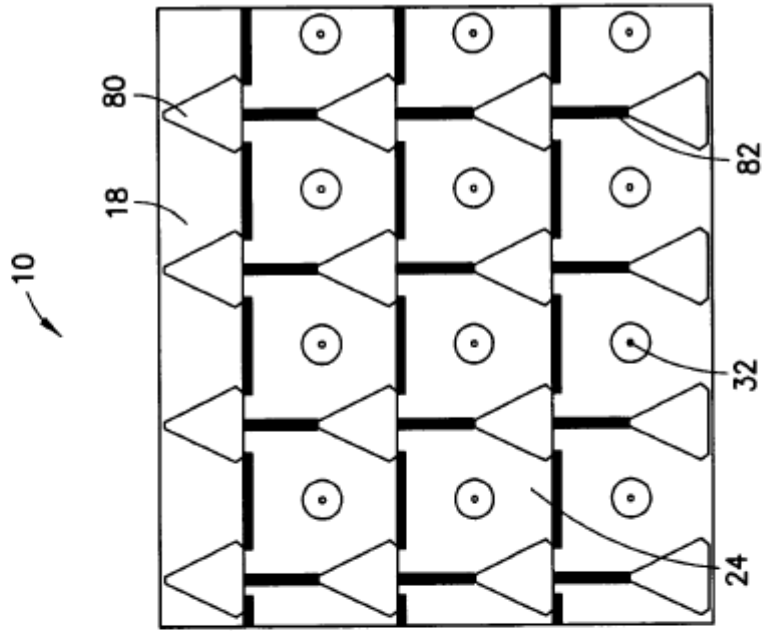


FIG. 21A

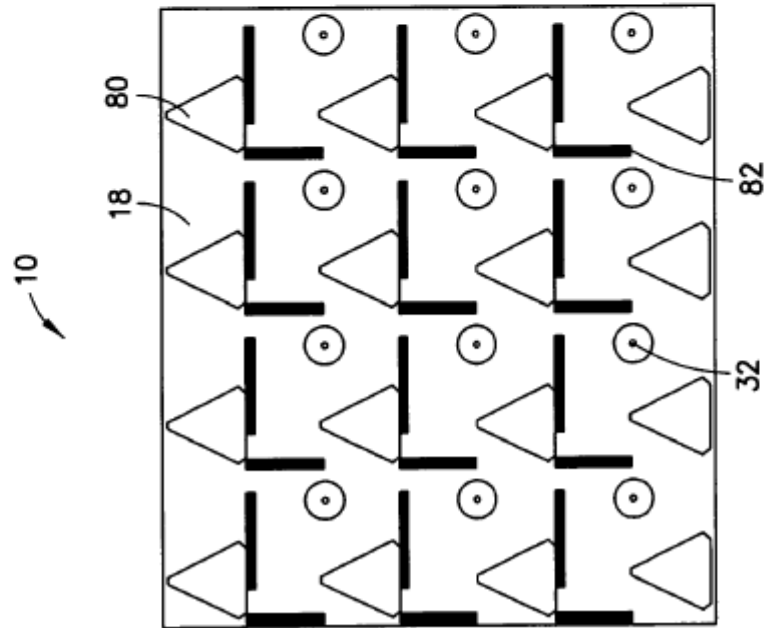


FIG. 21B

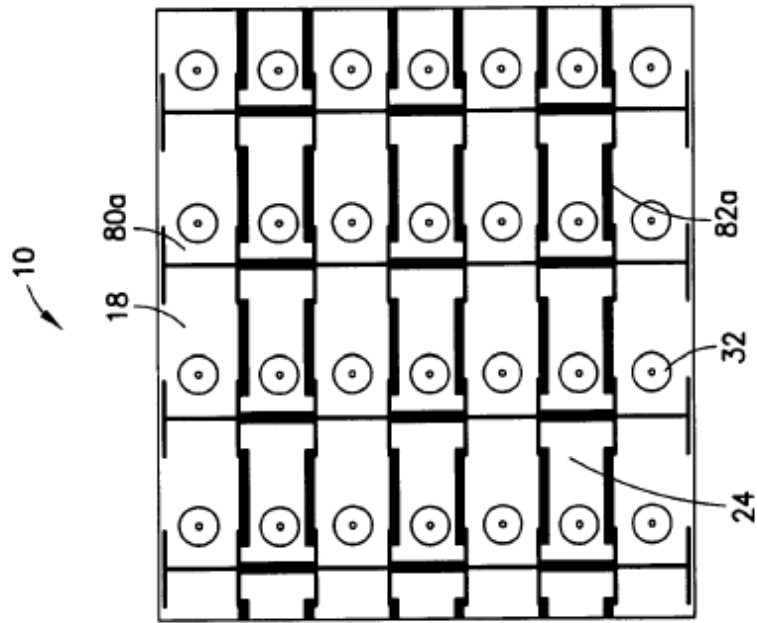


FIG. 22A

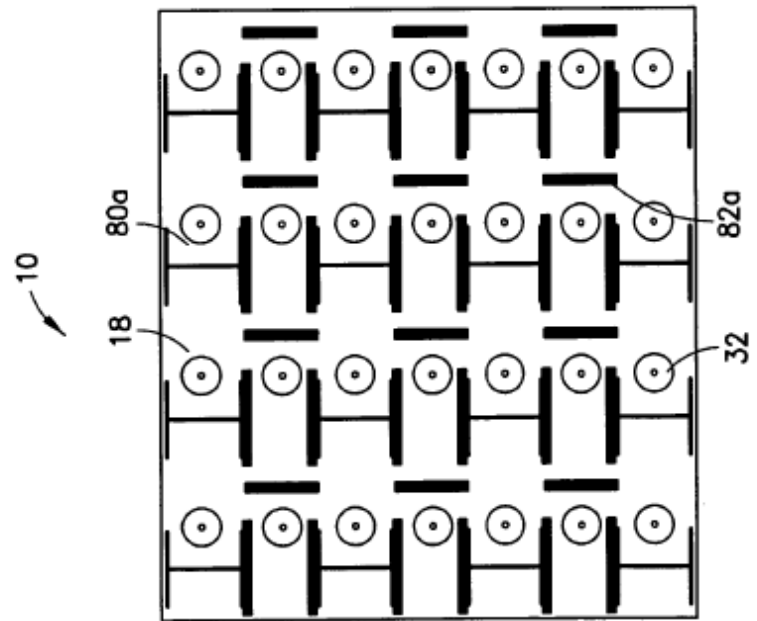


FIG. 22B

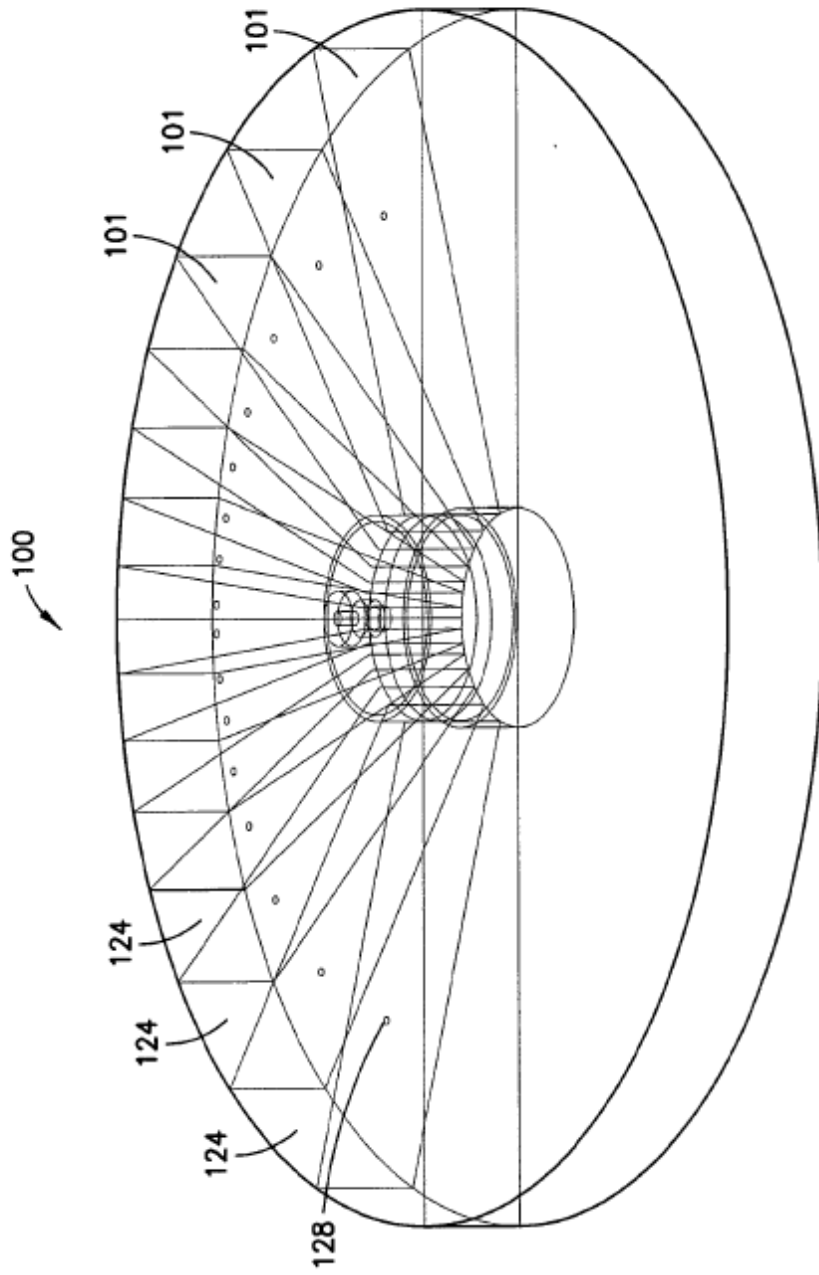


FIG.23

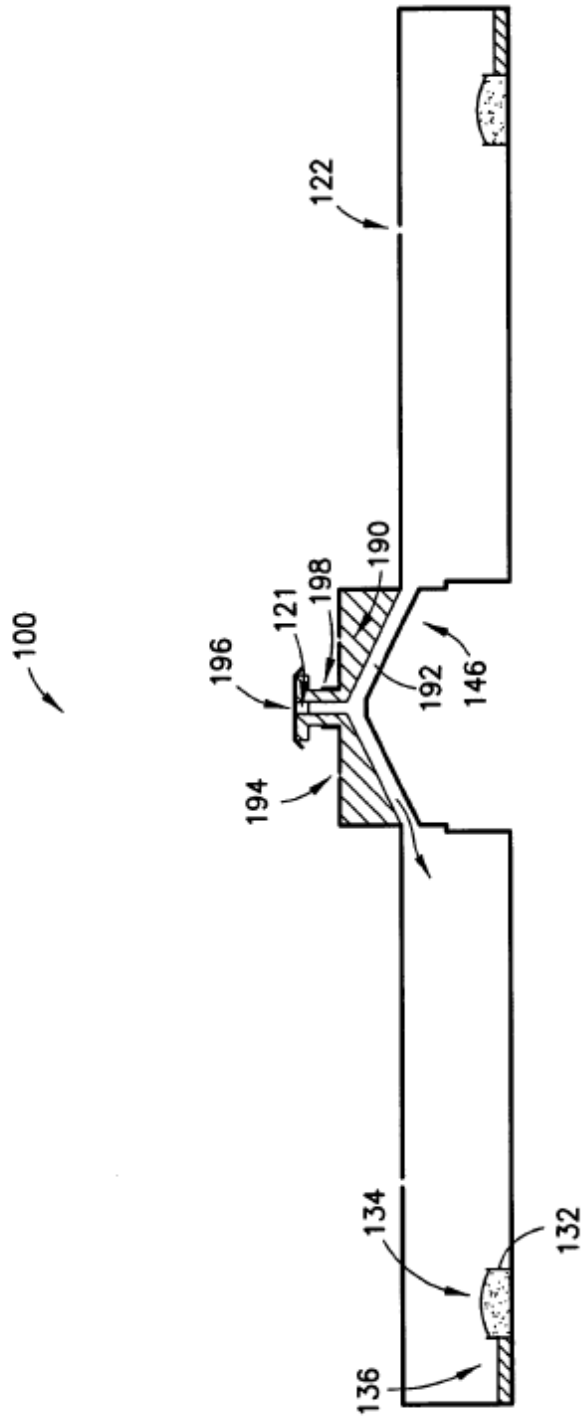


FIG.24

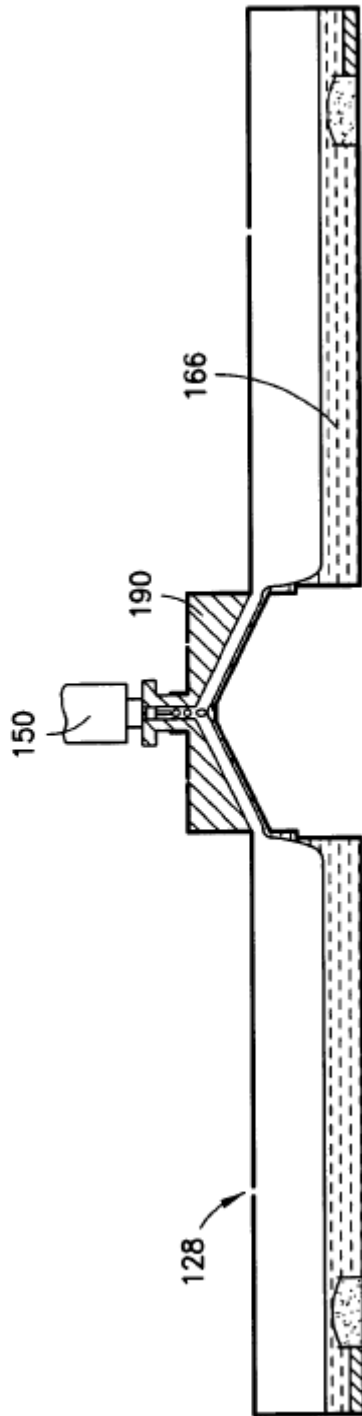


FIG. 25A

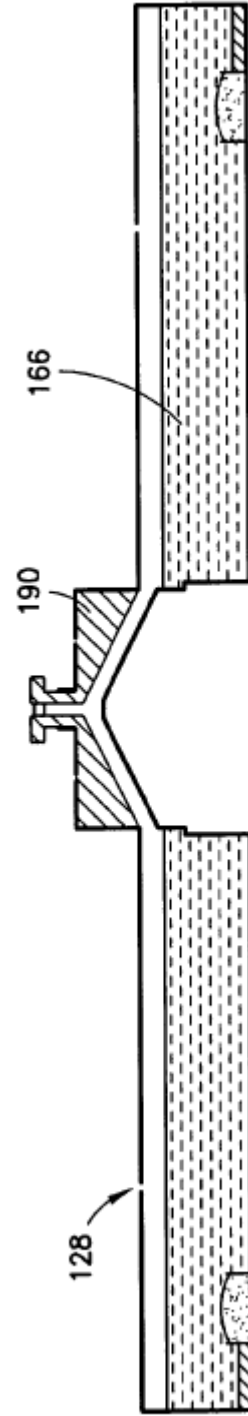


FIG. 25B

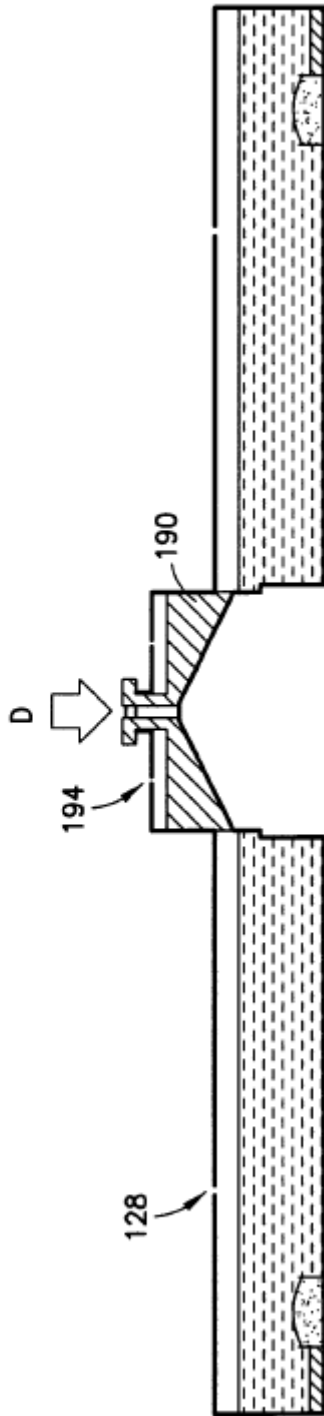


FIG. 26A

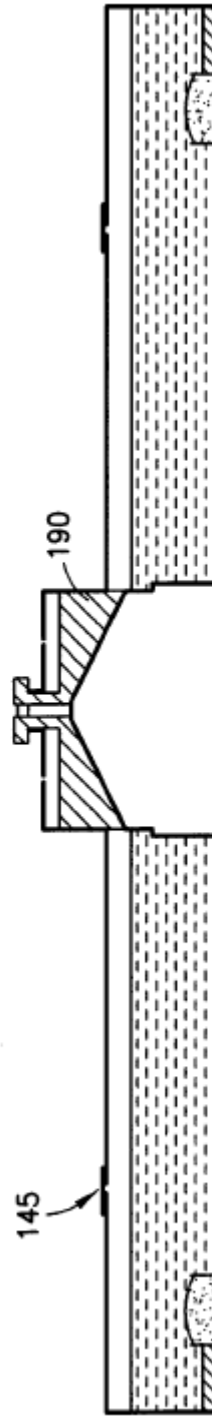


FIG. 26B

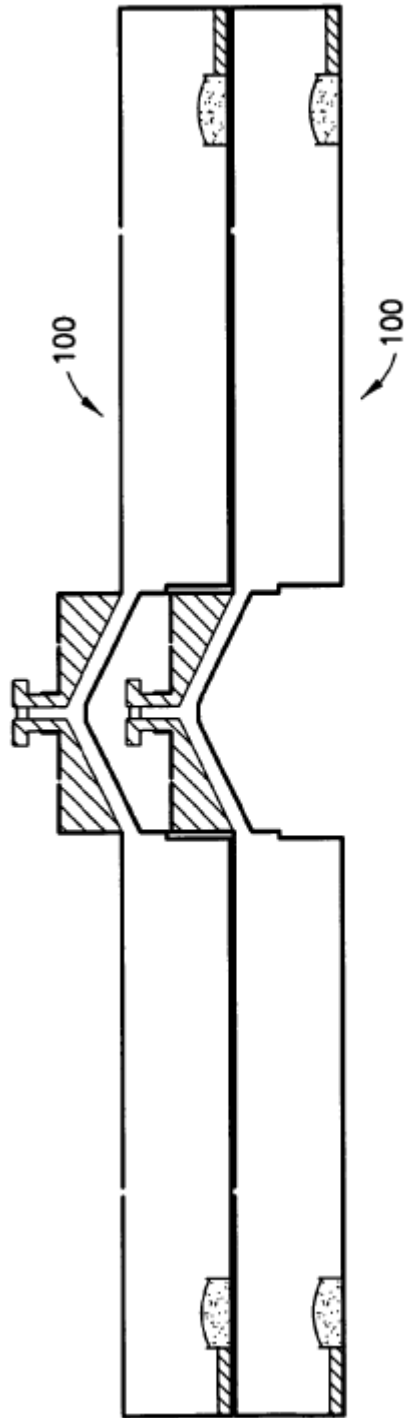


FIG.27