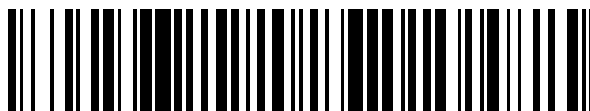


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 069**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/22** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**A61L 2/28** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/EP2015/000694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15165566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15722059 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3137623**

54 Título: **Dispositivo para preparación de muestras y método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad**

30 Prioridad:

**30.04.2014 EP 14290128**

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

**27.06.2019**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**OLIVIER, STÉPHANE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 718 069 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo para preparación de muestras y método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de preparación de muestras, preferiblemente para pruebas de esterilidad y carga biológica, por ejemplo, aplicable con fines de prueba en relación con el control de procesos de fabricación o para pruebas de productos finales en las industrias farmacéutica, biotecnológica, de alimentos y bebidas.

10 Los procesos de prueba de esterilidad o carga biológica requieren un método de preparación de muestras que implique consumibles específicos, hardware y pasos de preparación de muestras y el método se conoce como un método estandarizado en toda la industria. En la prueba de esterilidad basada en el crecimiento, la preparación de la muestra implica promover el crecimiento de cualquier microorganismo que va a ser detectado por un contacto directo de los medios de nutrición líquidos que se introducen por arriba de un filtro de membrana calibrado que retiene los microorganismos e incubando el recipiente con el filtro de membrana y medios de nutrición a una temperatura predeterminada. Los cambios en la turbidez de los medios de nutrición indican la presencia de microorganismos. Alternativamente, los microorganismos pueden detectarse visualmente en el filtro de membrana.

15 El equipo y los pasos de preparación de la muestra de la preparación de la muestra para dichas pruebas de esterilidad y carga biológica incluyen los siguientes pasos típicos:

1. Prehumedecimiento

El prehumedecimiento se utiliza para saturar la porosidad del filtro de membrana con el regulador de enjuague correcto para evitar o reducir el riesgo de unión de la molécula al filtro de membrana, principalmente en el caso de pruebas de esterilidad con antibióticos. Dicho proceso se describe, por ejemplo, en la European Pharmacopoeia 5.0, 2.6.1 Sterility.

20 Un recipiente con la solución reguladora, es decir, una botella, está conectado a dispositivos de preparación de muestras (recipientes de filtración) como el que se describe en el documento US 4036698 A, típicamente con una bomba peristáltica ubicada en una conexión de fluido entre el recipiente de la solución reguladora y los dispositivos de preparación de muestras. El proceso requiere iniciar y detener manualmente la bomba peristáltica, virar hacia adelante y hacia atrás el contenedor de la solución reguladora y destapar y tapar los cierres de ventilación en los dispositivos de preparación de muestras en un orden específico. Estos pasos se deben repetir en cada uno de dos o más dispositivos de preparación de muestras para cada tarea de prueba.

2. Filtración de la Muestra

30 Este paso se utiliza para concentrar los microorganismos en la superficie del filtro de membrana en los dispositivos de preparación de muestras. Un recipiente, es decir, una botella o jeringa, con un fluido de muestra se conecta con los dispositivos de preparación de muestras a través de la bomba peristáltica. El paso requiere iniciar y detener manualmente la bomba peristáltica, virar hacia adelante y hacia atrás el contenedor de muestras y tapar los cierres de los dispositivos de preparación de muestras en un orden específico. Estos pasos deben realizarse simultáneamente en cada uno de los dos o más dispositivos de preparación de muestras con una división igual y perfecta de la transferencia de muestras y el filtrado a través de los respectivos dispositivos de preparación de muestras.

35 3. Enjuague

40 Este paso se utiliza para enjuagar todos los tubos, las paredes internas del dispositivo de preparación de muestra o el recipiente para asegurar que todos los microorganismos se recolecten en la superficie del filtro de membrana. En este paso, la porosidad del filtro de membrana se enjuaga para eliminar cualquier inhibidor que pueda retrasar o prevenir el desarrollo del crecimiento de contaminantes potenciales (microorganismos). Este paso también requiere conectar un contenedor, es decir, una botella, con un líquido de enjuague con los dispositivos de preparación de muestras a través de la bomba peristáltica, y para iniciar y detener manualmente la bomba peristáltica, para virar hacia atrás y hacia adelante el contenedor con el fluido de enjuague y para enchufar y desenchufar las ventilaciones respectivas en los dispositivos de preparación de muestras en un orden específico para lograr el flujo de fluido deseado a través del volumen de los dispositivos. Este paso también debe realizarse en cada uno de los dos o varios dispositivos de preparación de muestras.

4. Adición de Medios de Crecimiento

50 Este paso se utiliza para llevar el volumen correcto de nutrientes (aeróbicos o anaeróbicos) a cada uno de los dispositivos de preparación de muestras sobre el filtro de membrana. Se conecta un contenedor de medios de nutrición a los dispositivos de preparación de muestras a través de la bomba peristáltica. El paso luego requiere cerrar manualmente la salida de los dispositivos de preparación de muestras, iniciar y detener la bomba peristáltica, virar hacia atrás y hacia adelante el contenedor de medios de nutrición, medir el volumen correcto y mantener la ventilación del dispositivo de preparación de muestras abierta y cerrarla en el lugar final del paso. Este paso se realiza normalmente con uno de los dispositivos de preparación de muestras con el medio aeróbico y luego en otro dispositivo de preparación de muestras con el medio anaeróbico.

5. Incubación

En este paso, los dos o más dispositivos o contenedores de preparación de muestras se incuban bajo las condiciones específicas de incubación para un desarrollo óptimo del crecimiento. La incubación se realiza por separado para los dispositivos o contenedores de preparación de muestras con los medios aeróbicos y anaeróbicos.

5 6. Lectura

Los cambios de turbidez o el desarrollo local de colonias en las membranas o filamentos del filtro en el fluido se detectan mediante una lectura regular, ya sea a simple vista o mediante tecnologías de inspección óptica automatizadas, para revisar y detectar el microcrecimiento biológico durante el término de incubación predeterminado.

7. Identificación

10 En caso de una detección positiva de una muestra, se extrae un líquido del dispositivo de preparación de la muestra o del recipiente con una jeringa o similar y posteriormente se realiza un análisis adicional.

Los pasos mencionados anteriormente son típicos para las pruebas de esterilidad y se han desarrollado una pluralidad de dispositivos de preparación de muestras para este proceso.

15 El documento US 4036698 A, por ejemplo, describe un método y un aparato de preparación de muestras para el análisis de soluciones tales como soluciones antibióticas para determinar la presencia de microorganismos. El dispositivo de preparación de muestras utilizado en este método comprende un recipiente formado como un cilindro de un material transparente. En un extremo del contenedor hay dos puertos, cada uno provisto con tapas de sellado removibles. Uno de los puertos incluye un filtro de membrana microporosa hidrófobo que está soportado mecánicamente en su lado exterior por un miembro de soporte y en el lado interno por un miembro de soporte similar.

20 El filtro realiza la función de filtrar todos los microorganismos por encima de un tamaño específico del flujo a través del filtro. El miembro de soporte poroso se forma como una rejilla en general espiral que permite que el fluido fluya a través de él mientras proporciona un soporte mecánico general uniforme para el filtro potencialmente frágil. El extremo opuesto del contenedor está cerrado por un miembro de base en donde se ubica un puerto adicional y está provisto de una tapa de sellado extraíble. Un filtro de membrana que tiene sustancialmente el diámetro total del contenedor está ubicado en la unión entre la pared del cilindro del contenedor y el miembro base y está sellado en su periferia exterior a la pared del contenedor. El filtro es una membrana porosa.

25

El uso de este dispositivo de preparación de muestras en el proceso descrito anteriormente incluye hacer fluir la solución que se va a analizar a través del recipiente de plástico desde un extremo que tiene el filtro de membrana microporosa que extrae microorganismos más allá de cierto tamaño de la solución. Los microorganismos que han pasado se concentran en el filtro de membrana en el extremo opuesto del recipiente. Posteriormente, el enjuague y el cultivo o los medios de crecimiento se conectan al contenedor para realizar los pasos en el orden mencionado anteriormente.

30

Una desventaja general del proceso es que los diversos recipientes externos o viales con medios de cultivo o de crecimiento y sustancias para generar la atmósfera anaeróbica se deben conectar y desconectar a los dispositivos de preparación de muestras o contenedores utilizados en cada tarea de prueba y debe ejecutarse una serie de pasos definidos que requieren grandes esfuerzos de manejo en una rutina predefinida y repetida con precisión.

35

El documento WO 2014/005669 A1 describe un dispositivo de preparación de muestras con diferentes cámaras.

El documento US 3448011 A describe un dispositivo de filtración e incubación bacteriológica que comprende una membrana de filtro y un émbolo.

40 Es el objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo de preparación de muestras, preferiblemente para pruebas de esterilidad, y un método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad usando el dispositivo que se mejora aún más con respecto a la eficiencia y precisión de realizar los pasos del proceso.

Para resolver la invención, la presente invención proporciona un dispositivo de preparación de muestras como se define en la reivindicación 1, un conjunto de preparación de muestras como se define en la reivindicación 12 y un método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad como se define en la reivindicación 13. En las reivindicaciones dependientes se definen realizaciones preferidas del dispositivo de preparación de muestras.

45

El dispositivo de preparación de muestras, por ejemplo para uso en el proceso de prueba de esterilidad, comprende una primera cámara que contiene un primer pistón móvil que separa un primer volumen corriente arriba y un segundo volumen corriente abajo del primer pistón, una segunda cámara que contiene un segundo pistón móvil que separa un tercer volumen corriente arriba y un cuarto volumen corriente abajo del segundo pistón/barrera, una entrada al primer volumen y una salida para el primer volumen. El primer volumen está conectado con el tercer volumen por una primera ruta de comunicación fluida y el segundo volumen está conectado con el cuarto volumen por una segunda ruta de comunicación.

50

- Los pistones móviles primero y segundo son barreras para separar los volúmenes respectivos corriente arriba y corriente abajo (o arriba y abajo si se supone una orientación sustancialmente vertical del dispositivo con una orientación sustancialmente horizontal de los pistones) del pistón respectivo en las cámaras respectivas antes, mientras y después de que se mueven en la cámara respectiva. Los términos "corriente arriba" y "corriente abajo" se utilizan para definir los dos lados de los pistones o volúmenes que separan independientemente de la orientación del dispositivo y estos términos no implican que se produzca un flujo de líquido que pasa a través de los pistones. En la descripción, el término "pistón/barrera" se usa para referirse a los aspectos estructurales y funcionales de este elemento, por lo que se entiende que la estructura ("pistón") se puede modificar siempre que la función ("barrera móvil") sea lograda.
- El dispositivo de preparación de muestras de la invención es un sistema cerrado en el cual una primera sustancia (es decir, un medio de nutrición) que debe introducirse selectivamente en una cámara que contiene otra sustancia (es decir, los microorganismos) y, opcionalmente, una segunda sustancia (es decir, se puede preparar un agente generador de gas en las cámaras respectivas del dispositivo y se puede mezclar selectivamente comunicando las distintas cámaras moviendo los pistones/barreras. En consecuencia, el uso del dispositivo de preparación de muestras de la invención, por ejemplo, en un proceso de prueba de esterilidad como se describe anteriormente, reduce el número de pasos para conectar/desconectar contenedores externos con dichas sustancias hacia/desde el contenedor de filtración y, por lo tanto, facilita el rendimiento de la cantidad de pasos, evita la contaminación y mejora la repetibilidad del proceso.
- Aunque la invención se describe con respecto al uso del dispositivo de preparación de muestras en un proceso de prueba de esterilidad, el dispositivo es útil en un sentido más general para procesos donde ciertas sustancias proporcionadas en un volumen deben transferirse selectivamente a otro volumen de una manera predecible. De manera confiable, segura, estéril y repetible.
- En una realización preferida, el primer volumen contiene un soporte de membrana sobre el cual se coloca una membrana o se puede colocar para separar el primer volumen en una cavidad corriente arriba y una cavidad corriente abajo de la membrana, en donde la entrada al primer volumen se comunica con uno de las cavidades corriente arriba y corriente abajo y la salida se comunican con la otra de las cavidades corriente arriba y corriente abajo. El dispositivo de preparación de muestras de esta realización preferida es específicamente adecuado para su uso en el proceso de prueba de esterilidad, ya que incluye o puede incluir el filtro de membrana microporoso que se usa para recolectar los microorganismos en la etapa de filtración, después de lo cual, en un solo proceso, se pueden agregar los medios de crecimiento o nutrición y, opcionalmente, la sustancia que genera una atmósfera aeróbica se puede agregar a la cámara con la membrana moviendo los pistones en el dispositivo.
- En una realización preferida, el primer pistón está adaptado para ser movido activamente en la primera cámara, preferiblemente por una fuerza aplicada desde el exterior del dispositivo, y el segundo pistón está adaptado para ser movido pasivamente como consecuencia de los cambios de presión inducidos en la segunda cámara por el movimiento del primer pistón en la primera cámara. Este dispositivo es específicamente ventajoso porque requiere solo una activación manual de solo uno de los pistones en el dispositivo y el otro pistón se traduce automáticamente dentro de su cámara. Este dispositivo facilita aún más el manejo del dispositivo de preparación de muestras y la realización de un proceso que requiere la adición de una o más sustancias a una cámara que contiene una muestra o componentes filtrados de una muestra que se va a analizar.
- El dispositivo de preparación de muestras de la invención es compatible con los procedimientos de preparación de muestras existentes, que incluyen filtración a alta presión y suministro de fluido mediante bombas peristálticas o una conexión directa con un tanque presurizado conectado a la entrada, y filtración al vacío utilizando un colector de vacío o una bomba de líquido conectada a la salida del dispositivo.
- El método de preparación de una muestra para la prueba de esterilidad de acuerdo con la invención comprende, por lo tanto, proporcionar al menos un dispositivo de preparación de muestras de acuerdo con la invención e incluir una membrana en el primer volumen, humedecer previamente la membrana, filtrar la muestra a través de la membrana, opcionalmente enjuagar la membrana, transfiriendo el medio de nutrición del cuarto volumen al segundo volumen moviendo el primer y segundo pistón, poniendo así el medio de nutrición en contacto con la membrana, incubando el dispositivo de preparación de muestras en condiciones de incubación específicas e inspeccionando la membrana para detectar existencia de microorganismos y/o extracción de microorganismos del dispositivo de preparación de muestras.
- La presente invención se describirá ahora en base a varias realizaciones preferidas que usan el dibujo adjunto. En este dibujo:
- La Figura 1 muestra una representación esquemática de un dispositivo de preparación de muestras de la presente invención para explicar el principio funcional;
- La Figura 2 muestra una vista en perspectiva en sección transversal de una realización preferida del dispositivo de preparación de muestras utilizando el principio mostrado en la Figura 1;
- Las Figuras 3A y B muestran detalles del dispositivo de preparación de muestras de la Figura 2 en funcionamiento;

La Figura 4 muestra el dispositivo de preparación de muestras de la Figura 2 con respecto a otros detalles de su funcionamiento;

La Figura 5 muestra una modificación del dispositivo de preparación de muestras de la Figura 2 con ciertas ventanas de visualización en una etapa de lectura de un proceso de preparación de muestras;

5 La Figura 6 muestra una modificación del dispositivo de preparación de muestras de la Figura 2 con una tapa extraíble;

La Figura 7 muestra una vista lateral en sección transversal y una vista en perspectiva de una realización adicional del dispositivo de preparación de muestras de la invención utilizando el principio mostrado en la Figura 1 con una disposición modificada de las cámaras;

10 La Figura 8 muestra un conjunto de preparación de muestras que incluye dos dispositivos de preparación de muestras del tipo que se muestra en la Figura 2.

El dispositivo de preparación de muestras de la invención y el método de preparación de una muestra para pruebas de esterilidad utilizando el dispositivo de preparación de muestras se describirán a continuación con referencia al principio esquemático del dispositivo y a diversas realizaciones específicas del principio.

15 La Figura 1 muestra el dispositivo 1 de preparación de muestras con sus elementos estructurales básicos. El dispositivo 1 de preparación de muestras comprende una primera cámara 2 que contiene un primer pistón/barrera 2c móvil que separa un primer volumen 2a anterior (corriente arriba) y un segundo volumen 2b por debajo (corriente abajo) del primer pistón/barrera 2c. Una segunda cámara 3 contiene un segundo pistón/barrera móvil 3c que separa un tercer volumen 3a arriba (corriente arriba) y un cuarto volumen 3b debajo (corriente abajo) del segundo pistón/barrera 3c. Se proporciona una entrada (no mostrada en la Figura 1) al primer volumen 2a y una salida 5 del primer volumen 2a. El primer volumen 2a está conectado con el tercer volumen 3a por una primera vía 6 de comunicación de fluido y el segundo volumen 2b está conectado con el cuarto volumen 3b por una segunda vía 7 de comunicación. El primer y segundo pistones/barreras 2c, 3c están ubicados, en una posición inicial, de manera que cierran la primera y la segunda vías 6, 7 de comunicación (mostradas en el lado izquierdo de la Figura 1).

25 El movimiento de los pistones desde la posición de inicio a una posición operativa (por ejemplo, que se muestra en el lado derecho en la Figura 1) en las cámaras respectivas abre selectivamente la primera y/o segunda vías 6, 7 de comunicación y establece una conexión de fluido entre el primer el volumen 2a y el tercer volumen 3a a través de la primera vía 6 de comunicación y entre el segundo volumen 2b y el cuarto volumen 3b a través de la segunda vía 7 de comunicación. Antes de que el primer pistón 2c se mueva a su posición operativa, la entrada (no se muestra) y la salida 5 está cerrada. La salida 5 está preferiblemente cerrada antes de mover el pistón 2c. La entrada (no se muestra) se cierra antes de mover el pistón si está a través de un puerto que se abre/cierra manualmente. La entrada puede cerrarse automáticamente con el primer pistón cuando el primer pistón se mueve a cierta distancia de su posición inicial. Mover los pistones de nuevo a sus posiciones de inicio puede volver a cerrar las rutas de comunicación y separar los volúmenes entre sí, aunque una sola apertura, es decir, una abertura en un solo sentido, podría ser suficiente para el proceso deseado.

35 El dispositivo que se muestra en la Figura 1 se puede usar preferiblemente para el proceso de prueba de esterilidad como se describe en la introducción. El cuarto volumen 3b de la segunda cámara en este caso se puede llenar previamente con un medio de crecimiento o nutrición y el segundo volumen 3a de la segunda cámara se puede llenar previamente con una sustancia de generación anaeróbica. Dicha sustancia de generación anaeróbica se conoce per se en forma de bolsitas generadoras de gas que consisten en una bolsita de reactivo que contiene carbonato inorgánico, carbón activado, ácido ascórbico y agua u otros ingredientes necesarios para crear una atmósfera específica para la incubación de la muestra. La sustancia se activa al exponerse al aire y la sustancia reduce rápidamente la concentración de oxígeno dentro del volumen respectivo. Al mismo tiempo, el carbonato inorgánico produce dióxido de carbono y esto produce la atmósfera adecuada para apoyar el aislamiento primario y el cultivo de bacterias anaeróbicas, microaerófilas o capnófilas mediante el uso de sustancias generadoras de gas del tipo respectivo dentro del tercer volumen de la segunda cámara. La exposición al aire se realiza y la sustancia se activa cuando el segundo pistón/barrera abre la primera vía 6 de comunicación moviéndose hacia abajo dentro de la segunda cámara como se muestra en el lado derecho de la Figura 1.

50 El primer pistón/barrera 2c está adaptado para ser movido activamente en la primera cámara 2, preferiblemente por una fuerza aplicada desde el exterior del dispositivo 1 a través de una varilla 13 del pistón que se extiende hacia el exterior del dispositivo. Este movimiento se muestra en principio en el lado derecho de la Figura 1. El segundo pistón /barrera 3c está adaptado para ser movido pasivamente como consecuencia de los cambios de presión inducidos en la segunda cámara 3 por el movimiento del primer pistón/barrera 2c en la primera cámara 2. Este movimiento pasivo se logra porque el tercer volumen contiene un gas que puede expandirse debido a las propiedades de dilatación del gas. El cuarto volumen 3b contiene típicamente un líquido que puede considerarse no expansible. Debido a la expansión de gas en el tercer volumen 3a y la presencia de líquido en el cuarto volumen 3b, y debido al primer volumen minimizado 2b en la posición inicial, el accionamiento del primer pistón/barrera 2c en la primera cámara 2 induce una traslación del segundo pistón/barrera 3c en la segunda cámara 3. La traslación del primer pistón 2c en la primera cámara 2 abre la segunda vía 7 de comunicación en o debajo del primer pistón y permite una transferencia de líquido

del cuarto volumen 3b al segundo volumen 2b. El movimiento inducido resultante del segundo pistón abre la primera vía 6 de comunicación entre el primer volumen y el tercer volumen permitiendo el intercambio de gases y, si se proporciona, generando un ambiente anaeróbico activando la sustancia de generación anaeróbica, por ejemplo un polvo o bolsita que genera gas, en el tercer volumen basado en el principio de activación descrito anteriormente.

5 La Figura 2 muestra una realización práctica del dispositivo de preparación de muestras de la invención, cuyo principio se explica sobre la base de la Figura 1, en donde la primera y la segunda cámaras 2, 3 están integradas en una disposición sustancialmente concéntrica con la segunda cámara que rodea la periferia de la primera cámara. Los mismos números de referencia se utilizan para identificar los elementos funcionales del dispositivo de preparación de muestras. El segundo volumen de la primera cámara no se muestra en este dibujo, ya que está ocupado por el primer pistón 2c. La Figura 2 muestra el dispositivo de preparación de muestras en la posición inicial. El primer volumen 2a contiene un soporte 8 de membrana en una parte superior del primer pistón 2c, soporte 8 de membrana sobre el cual se coloca una membrana 9 preferiblemente microporosa o se puede colocar para separar el primer volumen 2a en una cavidad 10a corriente arriba de la membrana 9 y una cavidad 10b corriente abajo de la membrana 9. Una entrada 4 (omitida en la Figura 1) al primer volumen 2a se forma en una pared periférica de la cámara interior o primera y comunica el exterior con la cavidad 10a corriente arriba en el primer volumen 2a de la primera cámara. Una salida 5 comunica el exterior con la cavidad 10b corriente abajo en el primer volumen 2a de la primera cámara. En este ejemplo, la salida 5 se extiende a través de una barra 13 del primer pistón 2c.

Se proporciona un medio de crecimiento o nutrición N en el dispositivo en el cuarto volumen 3b de la segunda cámara. Una sustancia de generación anaeróbica P (en forma de polvo o gránulos o una bolsa) se proporciona opcionalmente en el dispositivo en el tercer volumen 3a de la segunda cámara.

Como se muestra en la Figura 3A, la cavidad 10b corriente abajo de la membrana está formada por una estructura 11 de soporte en el primer pistón/barrera 2c que preferiblemente comprende una disposición de nervios y/o canales formados en la cara axial del primer pistón/barrera 2c. Como se muestra en la Figura 3B, el primer pistón/barrera 2c también contiene una o más aberturas 12 de comunicación que comunican el primer volumen 2a, preferiblemente la cavidad 10b corriente abajo de la membrana 9, si está provista, con el segundo volumen 2b. Estas aberturas 12 de comunicación se cierran cuando el primer pistón/barrera 2c está en la posición de inicio (que se muestra en las Figura 3A y 3B, lado izquierdo) y se abren cuando el primer pistón/barrera 2c se aleja de la posición inicial hacia la posición operativa (mostrada en la Figura 3B, lado derecho). Esto se logra porque la parte inferior del segundo volumen en la primera cámara contiene salientes 12a complementarios de acoplamiento recibidos en las aberturas 12 de comunicación para cerrar estas aberturas 12 cuando el primer pistón 2c está en la posición más baja o de inicio. El movimiento del primer pistón en la primera cámara no solo abre las aberturas 12 de comunicación, sino que también abre la segunda vía 7 de comunicación entre el cuarto volumen 3b y el segundo volumen 2b de la primera cámara formada debajo del primer pistón como se muestra en la Figura 3B.

El uso del dispositivo de preparación de muestras de las Figuras 2 y 3 en el proceso de prueba de esterilidad descrito anteriormente incluye el enjuague de la membrana 9 en el soporte de membrana a través de la entrada 4 y la salida 5, mientras que el primer y segundo pistones están en la posición inicial como se muestra en la Figura 3A. En el segundo paso, el fluido de muestra se transfiere al primer volumen 2a a través de la entrada 4 y la salida 5 para filtrar la muestra para concentrar los microorganismos en la superficie de la membrana 9. A continuación, se realiza el paso de enjuague, nuevamente a través de la entrada 4 y la salida 5 como en la técnica anterior, mientras que el primer y segundo pistones están todavía en la posición inicial.

Siguiendo los pasos de agregar el medio de crecimiento o nutrición y (opcionalmente) la generación de la atmósfera anaeróbica se realiza en una sola acción, ya que el primer pistón se mueve activamente desde la posición inicial que se muestra en la Figura 3A a la posición operativa que se muestra en Figura 3B, lado derecho. Este movimiento transfiere el medio de crecimiento o nutrición del cuarto volumen 3b en la segunda cámara 3 a través de la vía 7 de comunicación al segundo volumen 2b en la primera cámara y luego a la cavidad 10b debajo de la membrana 9 a través de las aberturas 12 de comunicación en el pistón. En la posición operativa, la entrada 4 está cerrada preferiblemente por el primer pistón/barrera 2c. El movimiento del primer pistón en la primera cámara induce el movimiento del segundo pistón 3c en la segunda cámara y este movimiento abre la primera vía 6 de comunicación entre el primer volumen 2a y el tercer volumen 3a. La comunicación establecida entre el primer volumen que servirá como cámara de incubación sobre la membrana y la sustancia de generación anaeróbica en el tercer volumen activa la sustancia para producir la atmósfera específica para la incubación de la muestra. La primera vía 6 de comunicación permite que la atmósfera específica se extienda hacia el primer volumen 2a o cámara de incubación sobre la membrana 9 y entre en contacto con las muestras de la membrana. La membrana 9 en el primer volumen puede apoyarse en una estructura 21 de malla provista en la superficie superior del primer pistón para limitar la deformación de la membrana y evitar el esfuerzo local que podría dañar la membrana y permitir que la muestra filtrada se drene a la salida 5 (puerto de salida). La estructura 21 de malla es visible en la Figura 3A, lado izquierdo después de que la membrana 9 se haya retirado con fines ilustrativos.

El movimiento activo del primer pistón en la primera cámara se efectúa mediante una cooperación del primer pistón/barrera 2c con un miembro 14 de tapa móvil separado unido o conectable al dispositivo 1 para poder transferir una fuerza aplicada desde el exterior al miembro 14 de tapa sobre el primer pistón/barrera 2c para mover el primer pistón/barrera 2c y para cerrar selectivamente/simultáneamente el puerto de salida 5 del primer volumen 2a que se

extiende preferiblemente a través de la varilla 13 móvil y una parte del primer pistón/barrera 2c. El principio se explica con referencia a la Fig. 4, que muestra los pasos para unir el miembro 14 de tapa al dispositivo (1), virar el dispositivo boca abajo (2) y mover el primer pistón en la primera cámara girando el miembro de tapa (3), girando y desplazando así axialmente el miembro 14 de tapa mediante un acoplamiento roscado entre el miembro de tapa y un receptáculo en el dispositivo.

Para mover el pistón desde la posición inicial a la posición operativa, el miembro 14 de tapa se atornilla en un receptáculo correspondiente en el dispositivo 1. Simultáneamente con el mismo, el puerto de salida 5 se cierra mediante una herramienta 14a de sellado de acoplamiento en el miembro 14 de tapa. El miembro 14 de tapa tiene un asa 14b u otra herramienta que soporta el agarre de la mano de un usuario o de un mecanismo para hacer girar el miembro de tapa en el receptáculo. Como la membrana se puede considerar como "hermética" debido al punto de burbuja de la membrana (por ejemplo, la presión de aire necesaria para eliminar el líquido retenido por capilaridad en la porosidad de la membrana), la presión requerida para pasar el punto de burbuja es mayor que 1 bar para la membrana microporosa utilizada típicamente en los procesos de prueba de esterilidad.

Al mover el pistón a la posición operativa como se describe anteriormente, el medio de crecimiento o nutrición N se transfiere del cuarto volumen al segundo volumen y a la cavidad 10b debajo de la membrana. Esta operación se puede realizar en una posición de arriba hacia abajo para permitir que los medios caigan en contacto con la membrana por gravedad y acumulen burbujas de aire en la parte superior del segundo volumen. Como se describió anteriormente, el movimiento activo del primer pistón en la primera cámara induce el movimiento pasivo del segundo pistón y la traslación del segundo pistón abre la vía de comunicación entre la cámara de incubación y el tercer volumen que contiene (opcionalmente) la sustancia de generación anaeróbica.

Preferiblemente, el miembro 14 de tapa se bloquea automáticamente en su posición final (ver Figura 4, (4)) y, si se desea por razones de seguridad, de una manera que no se puede quitar (es decir, proporcionando un acoplamiento de bloqueo). En esta posición, el primer pistón cierra la entrada 4 a la cámara de incubación del primer volumen y cualquier tubo externo conectado al puerto de entrada puede retirarse. Posteriormente, el dispositivo de preparación de muestras puede someterse a un manejo adicional que incluye la incubación de los dispositivos de acuerdo con el desarrollo aeróbico o anaeróbico en diferentes ambientes de temperatura y los pasos típicos de lectura y/o identificación. La Figura 5 muestra una modificación del dispositivo de preparación de muestras de la Figura 2 con ciertas ventanas 16, 17 de visualización transparentes en el lado de la cámara opuesta a la membrana para permitir la visualización del volumen de incubación o la membrana de la primera cámara, y en un pared(es) periférica(s) que circunda el medio de crecimiento o nutrición y, opcionalmente, el volumen que contiene la sustancia de generación anaeróbica lo que es ventajoso para permitir la inspección de la etapa de transferencia del medio/sustancia y permite la lectura y detección del crecimiento de microorganismos en la etapa de lectura de un proceso de preparación de la muestra.

La Figura 6 muestra una variación de la realización del dispositivo de preparación de muestras de la invención que tiene, en lugar de una entrada 4 en forma de puerto adaptado para conectarse a un tubo externo (o además de dicho puerto), una tapa 15 unida de manera removible a la primera cámara 2, en donde la tapa 15 es preferiblemente transparente para permitir la inspección del volumen de incubación o la membrana de la primera cámara, ya sea a simple vista o mediante el uso de dispositivos ópticos de detección automática. La tapa 15 extraíble también permite agregar fluidos de enjuague y/o muestra al primer volumen 2a del dispositivo a través de la parte 4a superior abierta de la primera cámara que sirve como entrada y esta figura muestra la secuencia de pasos para llenar el fluido de muestra en el dispositivo, filtrando la muestra a través de la salida 5 y cerrando la salida por medio de la tapa como se describió anteriormente, lo que inicia automáticamente la transferencia de los medios de nutrición a la cámara de incubación como se describió anteriormente.

Aunque no se muestra en el dibujo, el dispositivo de preparación de muestras de la realización que tiene el puerto 4 de entrada se puede usar directamente en un dispositivo de prueba en línea y, si es necesario, conectado permanentemente a los puertos de muestreo del equipo de laboratorio.

La Figura 7 muestra una realización adicional en la que la primera y la segunda cámaras no están dispuestas de manera concéntrica como en la Figura 2, sino que están dispuestas lateralmente pero, sin embargo, están conectadas integralmente en el dispositivo. La realización de la Figura 7 también tiene la tapa removible transparente que cierra el primer volumen o el volumen 2a de incubación. La segunda cámara se puede integrar con la primera cámara, pero también se puede unir de manera desmontable con la misma. Esto permite una fabricación fácil y modular del dispositivo de preparación de muestras, ya que la segunda cámara, que incluye los medios de nutrición deseados y, opcionalmente, la sustancia de generación anaeróbica está unida selectivamente a la primera cámara. Este concepto reduce la cantidad de componentes necesarios para producir dispositivos de preparación de muestras para diferentes aplicaciones de prueba. La conexión de la primera cámara y de la segunda cámara necesita establecer la comunicación de la primera y la segunda vías de comunicación entre los volúmenes respectivos.

La Figura 8 muestra un ejemplo de un conjunto de preparación de muestras que comprende dos dispositivos de preparación de muestras 1A, 1B del tipo que se muestra en la Figura 2/3 y un conjunto de tubos 18 diseñado para conectar las entradas de los dispositivos de preparación de muestras con una aguja con ventilación común o puerto de muestreo (no mostrado en el dibujo) para distribuir un fluido a los dispositivos de preparación de muestras en

alícuotas precisas. Los dos dispositivos de preparación de muestras en el conjunto incluyen uno para las condiciones anaeróbicas 1A y, en consecuencia, incluyen la sustancia de generación anaeróbica en el tercer volumen, mientras que el otro 1B es para condiciones aeróbicas y, en consecuencia, no incluye la sustancia de generación anaeróbica. El conjunto de tubos 18 puede diseñarse para la aplicación respectiva y podría haber más de dos de los dispositivos de preparación de muestras según la necesidad. Los dispositivos de preparación de muestras podrían cargarse con el mismo o con diferentes medios de nutrición en el cuarto volumen. Las tapas 14 utilizadas para taponar la salida y mover el primer pistón en la primera cámara como se describe también están preestablecidas en un embalaje 20 del conjunto. Se pueden incluir en el conjunto otros elementos funcionales de un equipo de prueba, incluidos tubos, soportes, agujas, etc. El paquete completo puede estar en un blíster esterilizado para evitar la contaminación del contenido preesterilizado. El uso del conjunto y la introducción del enjuague o de los fluidos de muestra a través del puerto de entrada y fuera del puerto de salida se pueden realizar como se describe en relación con la técnica anterior mediante el uso de bombas externas como bombas peristálticas, tanques presurizados o jeringas en la entrada o dispositivos de vacío en la salida. La incubación también se puede realizar como en la técnica anterior y las circunstancias dependen de los gérmenes o bacterias que se van a detectar pues tienen condiciones de crecimiento diferentes y específicas. Del mismo modo, los medios de crecimiento o nutrientes proporcionados en el dispositivo de preparación de muestras son específicos para el panel de gérmenes o bacterias que se van a detectar y para las condiciones ambientales y las condiciones de temperatura de incubación. Dado que algunos microorganismos requieren ambientes aeróbicos, mientras que otros requieren que las condiciones anaeróbicas crezcan, se proporcionan los dos dispositivos diferentes de preparación de muestras, uno con el polvo o el sobre de generación anaeróbica provistos en el tercer volumen de la segunda cámara y uno que no tiene dicha sustancia, por ejemplo teniendo un tercer volumen vacío que contiene gas atmosférico con oxígeno.

El dispositivo de preparación de muestras de la invención proporciona las siguientes ventajas, especialmente en relación con un método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad. El sistema está completamente cerrado durante todos los pasos de preparación de la muestra que comprenden la adición de medios de crecimiento y, opcionalmente, de sustancia de generación anaeróbica. La confiabilidad y repetibilidad de la preparación de la muestra se mejora porque la adición de los medios de crecimiento se realiza en un solo paso en lugar de en protocolos complejos de varios pasos. El dispositivo permite que se transfieran los volúmenes correctos y excluye los errores o la confusión con respecto a la asociación entre los medios de nutrición y la sustancia generadora anaeróbica. Se evitan los errores y peligros debidos a la omisión inadvertida del cierre de la entrada y la salida porque la entrada se cierra automáticamente cuando el pistón se mueve a la posición operativa, a la vez que la salida se cierra una vez que el miembro de la tapa utilizado para transferir activamente el primer pistón a la posición operativa está unido al dispositivo.

Al mismo tiempo, el dispositivo de preparación de muestras de la invención es compatible con equipos de laboratorio que incluyen bombas, tanques presurizados o sistemas de vacío para realizar los pasos preparatorios de enjuague y filtración de muestras. También es compatible con los actuales protocolos de incubación e identificación. Por último, el dispositivo de preparación de muestras facilita el manejo de los desechos, ya que reduce el número de contenedores separados e independientes utilizados en todo el proceso de prueba de esterilidad.



**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo (1) de preparación de muestras que comprende una primera cámara (2) que contiene un primer pistón (2C) móvil que separa un primer volumen (2A) corriente arriba y un segundo volumen (2B) corriente abajo del primer pistón (2C);
- 5 una segunda cámara (3) que contiene un segundo pistón (3C) móvil que separa un tercer volumen (3A) corriente arriba y un cuarto volumen (3B) corriente abajo del segundo pistón (3C); una entrada (4; 4A) al primer volumen (2A) y una salida (5) del primer volumen (2A); en donde el primer volumen (2A) está conectado con el tercer volumen (3A) por una primera vía (6) de comunicación y el segundo volumen (2B) está conectado con el cuarto volumen (3B) por una segunda vía (7) de comunicación;
- 10 y en donde la primera vía (6) de comunicación está cerrada por el segundo pistón (3C) en una posición de inicio y está adaptada para abrirse por un movimiento del segundo pistón (3C) hacia una posición operativa, y la segunda vía (7) de comunicación está cerrada por el primer pistón (2C) en una posición de inicio y está adaptada para abrirse por un movimiento del primer pistón (2C) en una posición operativa.
- 15 2. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer volumen (2A) contiene un soporte (8) de membrana en donde se coloca una membrana (9) o se puede colocar para separar el primer volumen (2A) en una cavidad (10A) corriente arriba y una cavidad (10B) corriente abajo de la membrana (9), comunicándose la entrada (4; 4A) al primer volumen (2A) con una de las cavidades corriente arriba y corriente abajo (10A, 10B) y la salida (5) que se comunica con la otra de las cavidades corriente arriba y corriente abajo (10A, 10B).
- 20 3. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una de las cavidades (10A, 10B) está formada por una estructura (11) de soporte en el primer pistón (2C) para la membrana (9), dicha estructura (11) de soporte comprende preferiblemente una disposición de nervaduras y/o canales formados en el primer pistón (2C).
- 25 4. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer pistón (2C) contiene una o más aberturas (12) de comunicación que comunican el primer volumen (2A), preferiblemente la cavidad (10B) corriente abajo de la membrana (9) si está provista, con el segundo volumen (2B), en donde las aberturas (12) de comunicación están cerradas cuando el primer pistón (2C) está en una/la posición de inicio y se abren cuando el primer pistón (2C) se mueve hacia a/la posición de funcionamiento.
- 30 5. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la entrada (4) está adaptada para ser cerrada por el primer pistón (2C) en una de sus posiciones móviles dentro de la primera cámara (2), preferiblemente en una posición operativa.
6. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el primer pistón (2C) está adaptado para ser movido activamente en la primera cámara (2), preferiblemente por una fuerza aplicada desde el exterior del dispositivo (1), y
- 35 el segundo pistón (3C) está adaptado para ser movido pasivamente como consecuencia de los cambios de presión inducidos en la segunda cámara (3) por el movimiento del primer pistón (2C) en la primera cámara (2).
7. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde una de las entradas (4) y salidas (5) a/desde el primer volumen (2A) se extiende a través de una parte del primer pistón (2C), preferiblemente a través de una varilla móvil (13) de la misma.
- 40 8. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el primer pistón (2C) está dispuesto para cooperar con una tapa (14) unida o que se puede unir al dispositivo (1) para poder transferir una fuerza aplicada desde el exterior al primer pistón (2C) para mover el primer pistón (2C) y cerrar selectivamente/simultáneamente el de la entrada (4) y la salida (5).
- 45 9. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la tapa (14) está soportada en el dispositivo (1) de manera que pueda girar y/o moverse axialmente.
10. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde una de las entradas (4A) y salidas (5) a/desde el primer volumen (2A) tiene la forma de una tapa (15) unida de manera desmontable a una abertura de la primera cámara (2), en donde la tapa (15) es preferiblemente transparente para permitir la inspección de a/la membrana (9) en el primer volumen (2A) de la primera cámara (2).
- 50 11. El dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el cuarto volumen (3B) se llena previamente con un medio nutritivo; y

el tercer volumen (3A) se llena previamente opcionalmente con una sustancia de generación anaeróbica.

12. Un conjunto de preparación de muestras que comprende:

dos o más dispositivos (1) de preparación de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y

5 un conjunto (18) de tubos diseñado para conectar las entradas de los dispositivos (1) de preparación de muestras con un conector común para distribuir un fluido a los dispositivos (1) de preparación de muestras.

13. Un método para preparar una muestra para pruebas de esterilidad, que comprende:

proporcionar al menos un dispositivo (1) de preparación de muestras de acuerdo con la reivindicación 11 e incluir una membrana (9) en el primer volumen (2A);

humedecer previamente la membrana (9);

10 filtrar la muestra a través de la membrana (9);

opcionalmente enjuagar la membrana (9);

transferir el medio de nutrición del cuarto volumen (3B) al segundo volumen (2B) moviendo el primer y segundo pistón (2C, 3C), poniendo así el medio de nutrición en contacto con la membrana (9);

incubar el dispositivo (1) de preparación de muestras en condiciones específicas de incubación; e

15 inspeccionar la membrana (9) para detectar la existencia de microorganismos y/o extraer microorganismos del dispositivo (1) de preparación de muestras.

Fig. 1

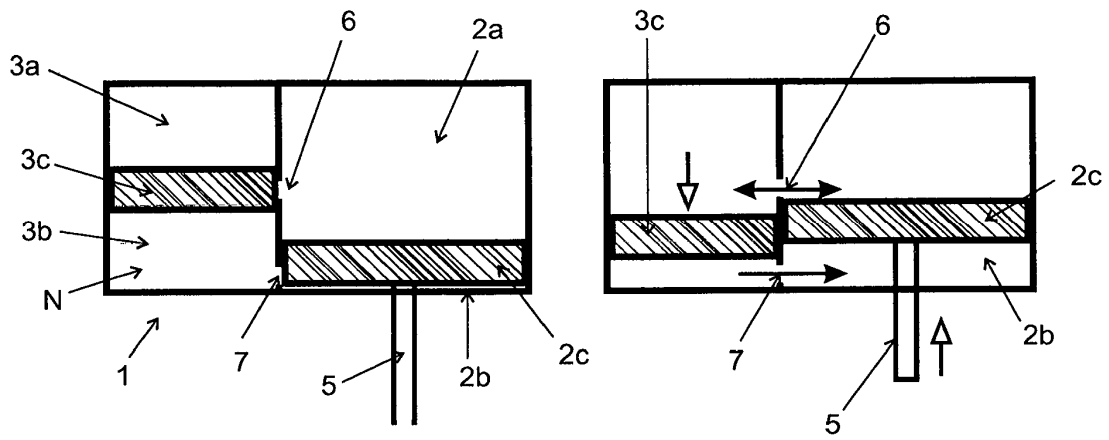


Fig. 2

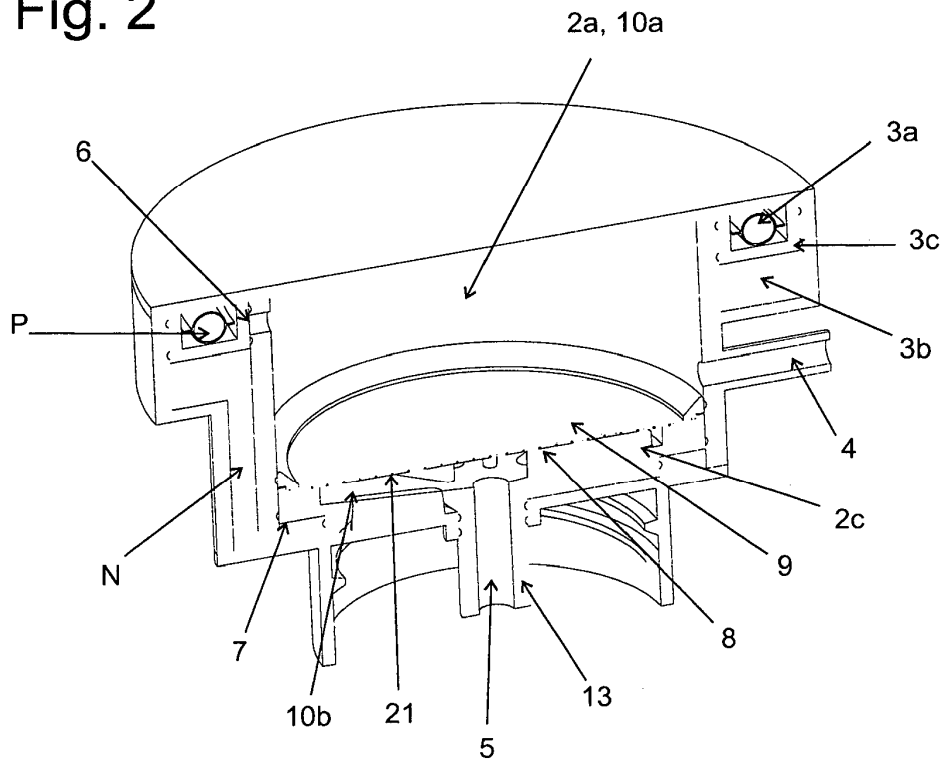


Fig. 3A

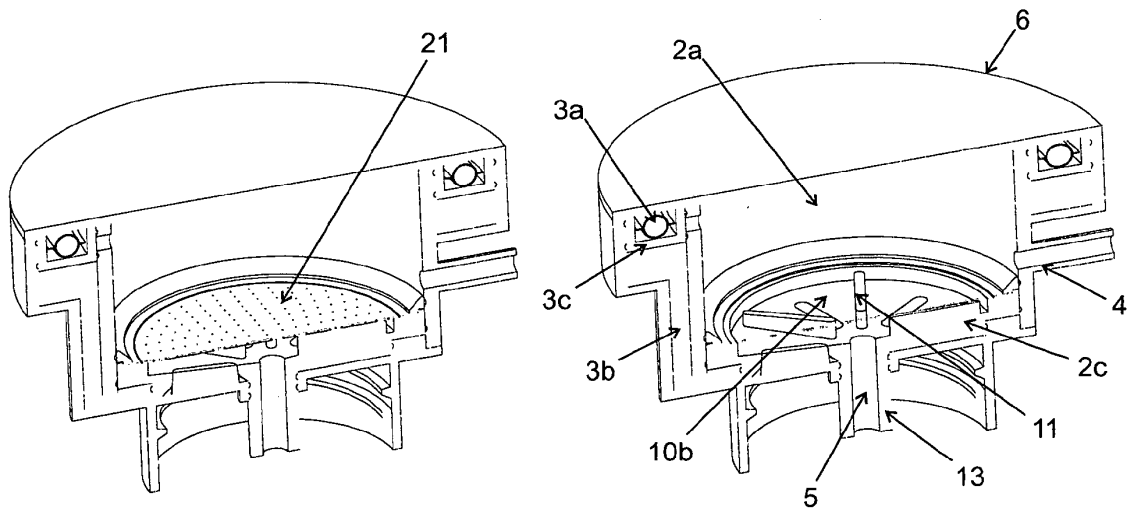


Fig. 3B

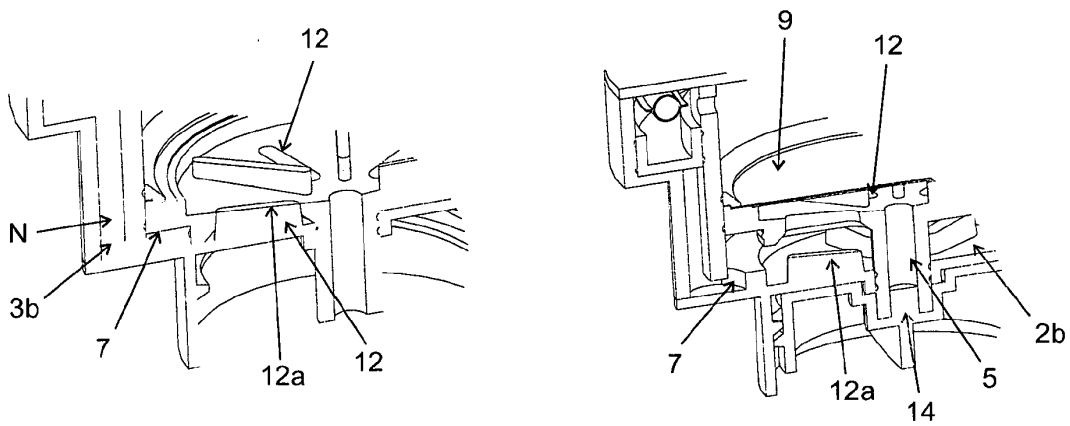


Fig. 4

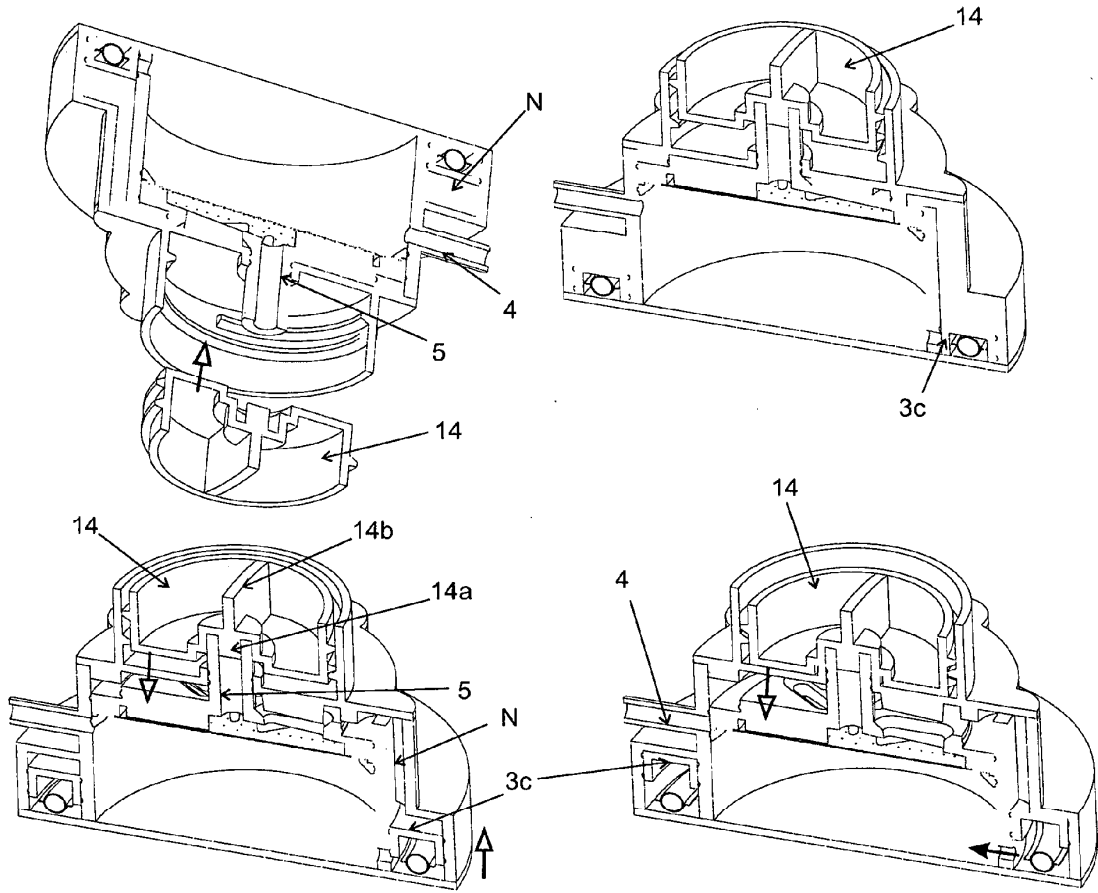


Fig. 5

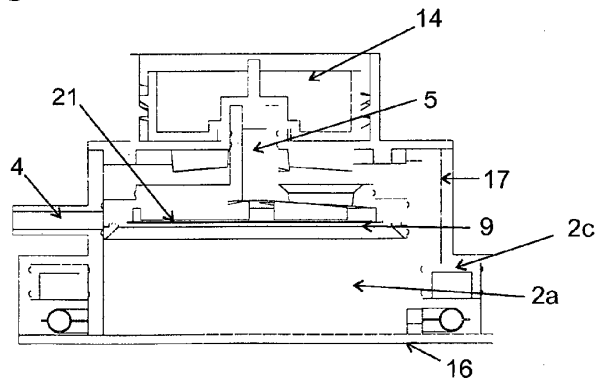


Fig. 6

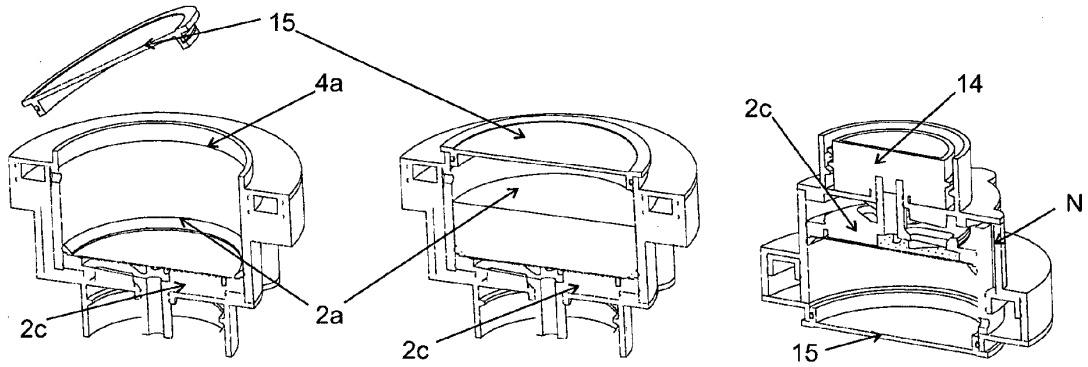


Fig. 7

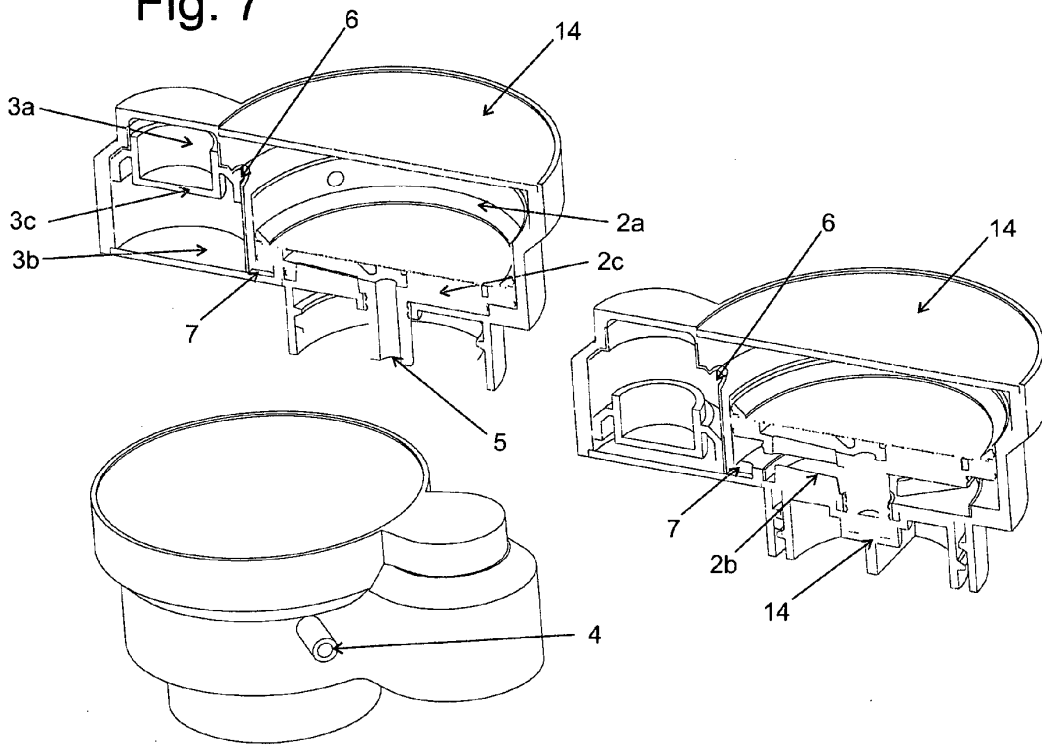


Fig. 8

